

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



CUANTIFICACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA POR RESONANCIA
MAGNÉTICA DE LA RELACIÓN GULTAMATO-GLUTAMINA EN LA
CORTEZA OCCIPITAL EN PACIENTES CON MIGRAÑA

TESIS DOCTORAL DE:

JESÚS GONZÁLEZ DE LA ALEJA TEJERA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

JESÚS HERNÁNDEZ GALLEGO

Madrid, 2013

©Jesús González de la Aleja Tejera, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**CUANTIFICACIÓN MEDIANTE
ESPECTROSCOPÍA POR RESONANCIA
MAGNÉTICA DE LA RELACIÓN
GLUTAMATO/GLUTAMINA EN LA
CORTEZA OCCIPITAL EN PACIENTES CON
MIGRAÑA.**

TESIS DOCTORAL

JESÚS GONZÁLEZ DE LA ALEJA TEJERA

Director:

PROF. JESÚS HERNÁNDEZ GALLEGO

Madrid, 2012

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizada la tesis doctoral, tengo la difícil tarea de sintetizar en pocas líneas mi gratitud hacia todos los que me apoyaron y me dieron el aliento necesario para concluir tan placentera como ardua tarea.

En primer lugar agradecer a **A.R.** la confianza que depositó en el proyecto desde el principio, no permitiendo que me desanimara a pesar de los obstáculos financieros iniciales, y poniendo finalmente todo su empeño para que el estudio pudiera realizarse. Sin ella, nada hubiera sido posible.

Mi eterna gratitud con el director de mi tesis, el Dr. **Jesús Hernández Gallego**, que desde un principio me apoyó y alentó para que hiciera el trabajo, y me aconsejó y guió durante la realización de la tesis.

Agradecer a **Virginia Mato** todo el trabajo realizado, los datos facilitados y las explicaciones ofrecidas, pero en general a todo el equipo de la Fundación Centro de Investigación en Enfermedades Neurológicas (C.I.E.N), quienes me abrieron las puertas de un centro de investigación de primera línea, multidisciplinar y ejemplarizante, haciendo que el trabajo fuera personal e intelectualmente reconfortante.

A. Martínez-Salio, J. Almajano, L. Calandre, S. Moreno, M. Penas, J. Francisco Gonzalo y C. Domínguez me remitieron los pacientes para poder ser incluidos en el estudio, gracias a ellos el trabajo siempre estuvo en marcha. Pero en general quiero agradecer a todos mis compañeros y amigos neurólogos del 12 de octubre, a los que siempre trato y trataré de emular; sin olvidar a los residentes que a diario me demuestran todo lo que me queda por aprender.

Por último, en el apartado personal, todo mi amor y gratitud a **Mónica**, mi esposa, por su inestimable apoyo y comprensión, por el abandono al que ha estado sometida durante todas las horas que he dedicado a este trabajo. También mil gracias a **Álvaro y Marcos**, que con sus juegos y risas hicieron que las horas de trabajo fueran cortas y fructíferas, deseando que finalizaran para volver a su lado. Ellos son lo más importante.

ÍNDICE GENERAL

I- INTRODUCCIÓN	10
I-1. CONCEPTOS GENERALES	11
I-2. MIGRAÑA CON AURA Y MIGRAÑA SIN AURA	14
I-3. FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA	15
I-3.1 La teoría vascular.....	15
I-3.2 La teoría neurogénica.....	15
I-3.3 El componente genético de la migraña	16
I-3.4 Hiperexcitabilidad cortical.....	19
I-3.5 Depresión cortical propagada (DCP).....	21
I-3.6 Relación entre la DCP y el aura migrañosa	22
I-3.7 Relación entre la DCP y la activación del sistema trigémino-vascular.....	24
I-4. LA CORTEZA CEREBRAL	26
I-4.1 Relación neurona/glia en el neocórtex.....	26
I-4.2 Ciclo Glutamato-glutamina.....	27
I-4.3 El astrocito y la DCP	29
I-5. ESTUDIOS DE ESPECTROSCOPIA EN MIGRAÑA.....	30
I-5.1 Nociones básicas sobre espectroscopía por resonancia Magnética (ERM)	30
I-5.2 Estudios ERM del núcleo del hidrógeno en la migraña.....	32
I-5.3 Estudios ERM del núcleo del fósforo en la migraña	33
II- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	34
II-1. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO.....	35
II-2. OBJETIVOS	36
III- MATERIAL Y MÉTODOS	42
III-1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	38
III-2. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES.....	39

III-3. SELECCIÓN DE LOS CONTROLES	40
III-4. RESONANCIA MÁGNÉTICA	41
III-5. ESPECTROSCOPÍA RESONANCIA MAGNÉTICA	44
III-6. RECOGIDA DE DATOS	46
III-7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
IV- RESULTADOS.....	48
IV-1. VALORACIÓN DE LA EXACTITUD DE LAS MEDICIONES.....	50
IV-2. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS SUJETOS.....	54
IV-3. RESULTADOS DE LA SEGMENTACIÓN DEL VÓXEL EN CO Y CPM.....	55
IV-4. DETERMINACIONES EN LA CORTEZA OCCIPITAL	56
IV-5. DETERMINACIONES EN LA CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL	58
IV-6. RELACIÓN ENTRE EL RATIO GLU/GLN EN FUNCIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS ATAQUES Y DE LA EDAD	61
V- DISCUSIÓN	63
V-1. RESUMEN DE LOS RESULTADOS	64
V-2. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	65
V-3. RESULTADOS EN EL CONTEXTO DE LA LITERATURA	69
V-4. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO.....	71
VI- CONCLUSIONES.....	75
VII-GLOSARIO Y ABREVIATURAS.....	76
VIII-BILIOGRAFÍA	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Migraña hemipléica familiar. Genes, canales, enzimas y mecanismos fisiopatogénicos propuestos en la literatura	18
Figura 2. Ciclo glutamato-glutamina	28
Figura 3. Imágenes de RM craneal axial y sagital ponderadas en T1. Localización de los vóxeles empleados para el estudio de ERM-H1 en la corteza occipital (A y B) y en la corteza prefrontal medial (C y D)	42
Figura 4. Superposición de la localización de los vóxeles empleados para el estudio de ERM-H1 en la corteza occipital (en amarillo) y en la corteza prefrontal medial (en rojo) con las áreas citoarquitectónicas detalladas por Brodmann	43
Figura 5. Imagen del espectro obtenido en región occipital en un paciente con migrañas. Cho (colina + fosfocolina), Cr (Creatina + fosfocreatina), Glu (glutamato), Gln (glutamina) y NAA (N-acetil aspartato+N-acetil aspartaril glutamato).....	45
Figura 6. Diagrama de tallo y hoja (<i>Stem & leaf</i>) de las SD% glutamina de todos los estudios de espectroscopia realizados, tanto en corteza occipital como en corteza prefrontal medial.....	50
Figura 7. Concentración absoluta de GLUTAMINA en la corteza occipital en controles y en pacientes con migraña	52
Figura 8. Concentración absoluta de GLUTAMINA en la corteza prefrontal medial en controles y en pacientes con migraña	53
Figura 9. Diagrama de cajas del ratio Glu/Gln en pacientes y controles en la corteza prefrontal medial (CPM) y en la corteza occipital (CO).....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios diagnósticos para migraña según ICHD-II.....	13
Tabla 2. Número de estudios realizados. Número de estudios incluidos en el análisis final, con la edad y número de migrañas al mes	54
Tabla 3. Volumen (cm ³) de sustancia blanca y sustancia gris en el vóxel situado en CPM (corteza prefrontal media) de 8 cm ³ y del vóxel situado en CO (corteza occipital) de 27 cm ³	55
Tabla 4. Ratio glutamato/glutamina y los valores absolutos de glutamato y glutamina en corteza occipital.....	56
Tabla 5. Ratio NAA/Cr, Cho/Cr, Glu/Cr y Gln/Cr en corteza occipital	56
Tabla 6. Ratio glutamato/glutamina y los valores absolutos de glutamato y glutamina en la corteza prefrontal medial	58
Tabla 7. Ratio NAA/Cr, Cho/Cr, Glu/Cr y Gln/Cr en corteza prefrontal medial.....	58

I- INTRODUCCIÓN

I- INTRODUCCIÓN

I-1. CONCEPTOS GENERALES

La migraña es un trastorno frecuente, que condiciona una incapacidad relevante en muchos de los pacientes que la sufren. Se calcula que afecta a un 18% de mujeres y a un 6% de hombres en la población general de América del Norte y Europa (*Stovner et al, 2006; Robbins et al, 2010*).

La migraña es una cefalea primaria episódica definida por sus características clínicas. La edad de inicio típica es en la adolescencia y prácticamente todos los pacientes han presentado crisis antes de los 30 años de edad. Es una cefalea característica, en la que el paciente prefiere permanecer en reposo, evitando los estímulos sensoriales y la actividad física o cognitiva. La cefalea interfiere con el desempeño de las actividades habituales y repercute significativamente en la calidad de vida del paciente (*Silberstein, 1995; Montagna et al, 2010*).

Las cefaleas en los pacientes con migrañas se presentan de forma recurrente aunque variable, con cambios en la frecuencia de presentación. Hay individuos que presentan escasos episodios de cefalea migrañosa a lo largo de su vida, y en el extremo opuesto, pacientes que de manera frecuente, durante largos periodos de tiempo, pueden llegar a presentar cefaleas de manera diaria o semanal (*Pascual, 2009*).

El ataque de migraña prototipo consiste en una secuencia de eventos que incluye: los síntomas premonitorios (pródromos), el aura, la cefalea y la fase de resolución de la cefalea. Existe una marcada variabilidad intra e interindividual en las características de los ataques de migraña, y varios son los síntomas descritos y asociados a cada una de las fases (*Linde et al, 2006; Cuadrado et al, 2008; Porta-Etessam 2011*).

Distinguimos entre migraña sin aura (MSA) o con aura (MCA) en función de los síntomas neurológicos transitorios y focales (visuales, sensitivos o alteraciones del lenguaje) que preceden o acompañan a la cefalea. Hasta un 30% de los pacientes con migrañas experimentan en alguna ocasión auras. En más del 90% de las crisis de migraña con aura, los síntomas focales son visuales, ocasionalmente acompañados de déficits sensitivos y, en menor medida, de alteraciones en el lenguaje (*Silberstein, 1995; Pascual, 2009*).

Los criterios diagnósticos han sido revisados en la segunda edición de la ICHD-2 (*International Classification of Headache Disorders*) (*Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society, 2004*) (**Tabla 1**).

El diagnóstico de migraña puede realizarse de forma fiable en base a criterios clínicos. Aunque los criterios de la ICHD-2 pueden parecer categóricos y arbitrarios, han ayudado mucho a homologar conceptos y trabajos de investigación tanto básicos como clínicos.

Tabla 1. Criterios diagnósticos para migraña según ICHD-II

Migraña sin aura

- A. Al menos 5 ataques que cumplan los criterios B-D.
- B. Cefalea que dura de 4 a 72 horas (sin tratamiento o insuficientemente tratada).
- C. Cefalea que reúna dos de las siguientes características:
 - 1. Localización unilateral.
 - 2. Calidad pulsátil.
 - 3. Dolor de moderada a severa intensidad.
 - 4. Empeora con el ejercicio o el paciente evita la actividad física habitual.
- D. Durante la cefalea ocurra uno de los siguientes:
 - 1. Náuseas y/o vómitos.
 - 2. Fotofobia o sonofobia.
- E. No atribuida a otra enfermedad.

Migraña con aura

- A. Al menos 2 ataques que cumplan con el criterio B.
- B. Migraña con aura que cumplan con los criterios B-C para alguna de las subformas (migraña con aura típica, cefalea no migrañosa con aura típica, cefalea sin aura típica, migraña hemipléjica familiar, migraña hemipléjica esporádica, o migraña tipo basilar).
- C. No atribuida a otra enfermedad.

Migraña con aura típica

- A. Al menos 2 ataques que cumplan con los criterios B-D.
- B. Aura consistente en al menos uno de los siguientes, pero no debilidad motora:
 - 1. Síntomas visuales totalmente reversibles incluyendo rasgos positivos (destellos luminosos, escotomas o líneas, etc.) y/o rasgos negativos (pérdida de la visión).
 - 2. Síntomas sensoriales totalmente reversibles incluyendo rasgos positivos (alfileres y agujas) y/o rasgos negativos (entumecimiento).
 - 3. Alteraciones totalmente reversibles de lenguaje disfásico.
- C. Al menos 2 de los siguientes:
 - 1. Síntomas visuales homónimos y/o síntomas sensoriales unilaterales.
 - 2. Al menos uno de los síntomas del aura se desarrolla gradualmente de ≥ 5 minutos y/o diferentes síntomas del aura ocurren en sucesión de ≥ 5 minutos.
 - 3. Cada síntoma dura ≥ 5 y ≤ 60 minutos.
- D. La cefalea cumple con los criterios B-D para “Migraña sin aura” comenzando durante el aura o seguido del aura dentro de los 60 minutos.
- E. No atribuida a otra enfermedad.

I-2. MIGRAÑA CON AURA Y MIGRAÑA SIN AURA. Manifestaciones distintas de una misma entidad.

La migraña sin aura y la migraña con aura típica pueden ser manifestaciones distintas de una misma entidad nosológica, y aunque ampliamente discutido en la literatura científica, las siguientes observaciones apoyarían esta idea (*Blau, 1995; Ayata et al, 2006*):

- 1) Las características de la cefalea son comunes a ambas entidades.
- 2) Un mismo individuo puede padecer episodios de migraña con o sin aura a lo largo de su vida.
- 3) En una misma familia, puede haber miembros que presenten migrañas con o sin aura, o ambas.
- 4) Los tratamientos sintomáticos agudos y preventivos utilizados son igual de eficaces en la migraña con aura como sin aura

I-3. FISIOPATOLOGÍA DE LA MIGRAÑA

Aunque se conocen parte de los procesos fisiopatológicos que en un paciente susceptible se suceden durante el ataque de migraña, el motivo por el que se inicia un episodio y los determinantes que confieren a un individuo la susceptibilidad son desconocidos.

I-3.1 La teoría vascular

Hasta hace tres décadas se pensaba que la migraña era la consecuencia de una alteración en los vasos intracraneales. La teoría vasogénica propuesta por Wolff, concluía que los síntomas focales y transitorios (auras) que experimentaban los pacientes migrañosos eran la consecuencia de la vasoconstricción transitoria de las arterias intracraneales, y que la cefalea se producía por la vasodilatación de rebote ocurrida en los vasos cerebrales y meníngeos. Explicaban de esta forma la cualidad pulsátil de la cefalea, el hecho de que los síntomas se aliviasen con tratamientos vasoconstrictores como los ergóticos y que la estimulación de los vasos intracraneales en pacientes en vigilia durante una craneotomía produjera una cefalea ipsilateral intensa (*Graham et al, 1938; Ray et al, 1940; Wolff, 1963*).

I-3.2 La teoría neurogénica

En la actualidad es la teoría neurogénica la que permite explicar y compilar de forma satisfactoria gran parte de los datos y estudios realizados en las dos últimas décadas. La teoría neurogénica sitúa el origen de la migraña en la corteza cerebral; la hiperexcitabilidad cortical actuaría como uno de los posibles sustratos fisiopatogénicos; el incremento en la actividad neuronal sería responsable de la depresión cortical propagada (DCP); los cambios en el calibre de los vasos cerebrales

y menínges serían reactivos y en gran medida la consecuencia de la disfunción cortical; y la cefalea se produciría como el resultado de la activación del sistema trigémino-vascular (STV) (Welch, 2003; Sánchez del Río et al, 2006; González de la Aleja et al, 2006; Cutrer, 2006).

Sin embargo, la secuencia teórica propuesta es incorrecta para otros autores y, aunque sitúan en el cerebro el origen de la migraña, plantean que una posible alteración o regulación anómala de las estructuras troncoencefálicas encargadas del procesamiento y modulación del dolor serían las responsables de la cefalea en los pacientes con migrañas (Goadsby et al, 2009).

I-3.3 El componente genético de la migraña

La migraña es un trastorno con una importante carga genética, con una herencia multifactorial no mendeliana. Varios son los *loci* identificados y los posibles genes candidatos implicados en la migraña, pero todavía hay una falta de consistencia y de replica entre los diferentes estudios llevados a cabo (Oterino et al, 2012, Van den Maagdenberg et al, 2007; Wessman et al, 2007). Estudios recientes "de asociación de amplitud genómica" ('*genome-wide association studies*') parecen limitar la susceptibilidad a padecer migraña a menos de cinco *loci* (Chasman et al, 2011). Unos de estos locus podría contener una región del genoma encargada de regular un gen responsable de inducir una disminución en la síntesis del transportador de glutamato EAAT2 (*excitatory amino acid transporter*), situado en los astrocitos en la terminal sináptica (Anttila et al, 2010; Anttila et al, 2011).

En el caso de la Migraña Hemipléjica Familiar (MHF), muy infrecuente enfermedad de herencia monogénica, autosómica dominante, se han identificado tres alteraciones genéticas diferentes (**Figura 1**), que podrían ser responsables en última instancia de un incremento en la hiperexcitabilidad cortical (Moskowitz et al, 2004).

La MHF tipo1 es debida a la mutación del gen CACNA1A (cromosoma 19p13) que codifica para la subunidad que forma el poro en el canal de Cav2.1 (canal del calcio dependiente de voltaje tipo P/Q), situado en las terminales presinápticas de las neuronas. La mutación de este canal iónico produce una ganancia de función, es decir, un incremento del flujo de calcio a la terminal presináptica en respuesta a la despolarización neuronal y un aumento del neurotransmisor glutamato liberado en la sinapsis (*Tottene et al, 2009*).

En la MHF tipo 2 el gen responsable (ATP1A2) codifica la subunidad alfa de la bomba Na⁺/K⁺ situada en los astrocitos. Se ha planteado que la pérdida de función derivada de la mutación produciría durante la actividad neuronal mantenida una disminución del aclaramiento del K⁺ del espacio sináptico y una disminución de la recaptación de glutamato por los astrocitos (los transportadores de glutamato situados en los astrocitos utilizan un gradiente de sodio).

Los modelos animales transgénicos, portadores de la mutación responsable de MHF tipo 1 y de MHF tipo 2, muestran un umbral disminuido para la generación de la DCP y un incremento en la velocidad de propagación de ésta (*Van den Maagdenberg et al, 2004; Leo et al, 2011*).

Una mutación en el gen SCN1A es responsable de la MHF tipo 3 (*Dichgans et al, 2005*). El análisis funcional realizado en esta mutación muestra una inactivación más lenta y una recuperación más rápida de este canal de sodio voltaje dependiente lo que podría producir un incremento de la actividad neuronal (*Vanmolkot et al, 2007*).

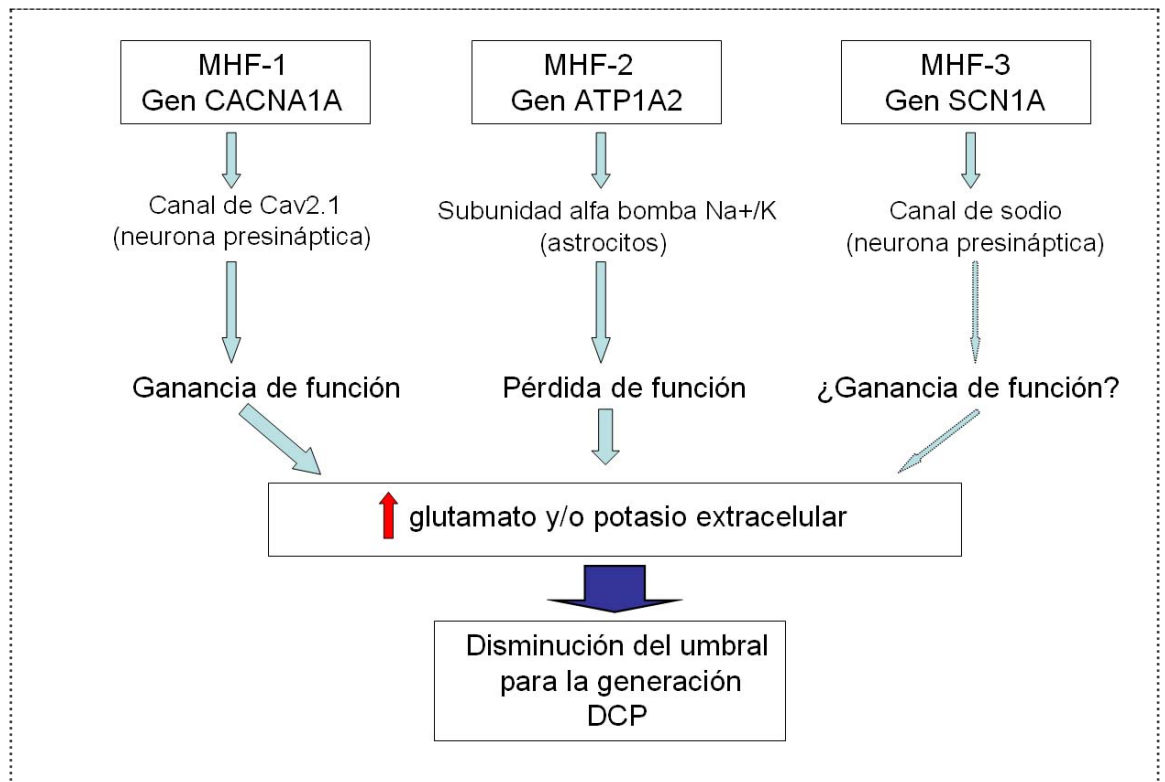


Figura 1. Migraña hemipléjica familiar. Genes, canales, enzimas y mecanismos fisiopatogénicos propuestos en la literatura.

I-3.4 Hiperexcitabilidad cortical

Muchas son las publicaciones que sugieren que en la corteza cerebral de los sujetos con migraña existe una hiperexcitabilidad durante el período interictal, especialmente en el córtex occipital, que les confiere cierta susceptibilidad a padecer la enfermedad (*Welch, 2003*).

Estudios realizados con **estimulación magnética transcraneal (EMT)** han demostrado que la intensidad de los estímulos magnéticos aplicados en el córtex occipital para inducir fosfenos (magnetofosfenos) es significativamente menor en los pacientes con migraña respecto a los controles sanos (*Aurora et al, 1998; Aurora et al, 2003; Young et al, 2004*). Aunque existen estudios que no obtienen los mismos resultados (*Afra et al, 1998*), probablemente por diferencias metodológicas, estos datos se han interpretado como una evidencia neurofisiológica de la mayor hiperexcitabilidad de la corteza occipital en los pacientes con migraña durante el periodo interictal (*Aurora et al, 1999*). Esta disminución del umbral para inducir fosfenos con EMT durante el periodo interictal no se limita al área visual primaria (V1), sino que también se ha demostrado en áreas visuales extraestriadas, como el área V5 (*Battelli et al, 2002*).

Aunque los estudios realizados aportan datos discordantes (*Van der Kamp et al, 1996*), cuando la EMT se aplica sobre la corteza motora y se estudia la latencia, la amplitud del potencial motor evocado (PME) o la intensidad de los estímulos que se necesita aplicar para producir un PME, no se encuentran diferencias significativas entre los sujetos control y los individuos con migraña (*Ozturk et al, 2002; Ambrosini et al, 2003*), lo que para algunos autores supondría que la hiperexcitabilidad podría encontrarse limitada al córtex occipital. Sin embargo, *Cosentino et al.*, demostraron que incrementando la intensidad de los estímulos aplicados mediante EMT, la amplitud obtenida en el PME era significativamente mayor en los pacientes con migraña respecto a los controles, incremento que no se producía cuando se

administraba tratamiento con levetiracetam (fármaco antiepiléptico que por mecanismos no bien conocidos parece disminuir la exocitosis de neurotransmisores en la terminal presináptica), lo que implicaría una mayor hiper-reactividad de la corteza cerebral, según los autores como reflejo de diferencias en la neurotransmisión glutamatérgica en los pacientes con migraña (*Cosentino et al, 2011*).

Varias son las publicaciones que sugieren diferentes anomalías visuales de origen cortical en la migraña (*Chronicle et al, 1995; McKendrick et al, 2004*). McKendrick *et al.*, concluyeron que en los individuos con migraña existen anormalidades cuantificables cuando se analiza el procesamiento cortical de imágenes en movimiento mediante MCP (*motion coherence perimetry*) que podrían explicarse por un posible aumento del ruido neuronal basal como sustrato de una hipexcitabilidad cortical (*McKendrick et al, 2004*). Considerando la hiperexcitabilidad neuronal como una disminución del umbral de respuesta a determinados estímulos o como un aumento de la amplitud de la respuesta a estímulos que superan un determinado umbral, varios estudios neurofisiológicos han demostrado diferencias entre las respuestas obtenidas con potenciales evocados en los pacientes con migrañas respecto a los controles (*Schoenen et al, 2003*). Cuando se utilizan estímulos visuales en patrón alternante de forma continua y repetitiva, para valorar los **potenciales visuales evocados** (PVE), el hallazgo que se ha observado de forma consistente es la falta de habituación de los PVE (es decir, una ausencia en la normal disminución de la amplitud del potencial evocado mientras el estímulo persiste), e incluso potenciación de éstos en el periodo interictal (*Ambrosini et al, 2006; Afra et al, 1998*). La falta de habituación se ha demostrado también como respuesta a estímulos auditivos (*Ambrosini et al, 2003*) o somatosensoriales (*Ozkul et al, 2001*). Por el momento, se desconoce el motivo por el que, en los sujetos con migraña, existe una falta de habituación de los potenciales evocados durante el período interictal y la relación que pudiera tener en la patogénesis de la migraña. El fenómeno de habituación constituiría un mecanismo adaptativo que protegería el córtex de una sobrecarga sensorial, por lo

que se ha planteado que los pacientes con migrañas serían más vulnerables ante un incremento en las necesidades sostenidas de procesamiento de la información externa (*Giffin et al, 2002*). Ni las alteraciones halladas en el procesamiento visual (*McKendrick et al, 2004*) ni los datos obtenidos en estudios con potenciales corticales evocados parecen guardar relación con la frecuencia de los episodios migrañosos ni con la duración de la enfermedad (*Afra et al, 1998*). Aunque existen diferentes posturas respecto a si la hiper-reactividad observada en la corteza occipital en pacientes con migrañas es debida a una hiperexcitabilidad cortical (*Aurora et al, 1999; Martín et al, 2011*) o una alteración en los mecanismos adaptativos a la estimulación luminosa (*Afra et al, 1998*), lo que parece común a los diferentes estudios es la existencia de un funcionamiento cortical diferente en los sujetos con migraña respecto a los controles (*Schoenen et al, 2003*).

Mediante **electroencefalografía** (EEG) se ha demostrado que en pacientes con migraña, con o sin aura, se observa de manera consistente una respuesta fotoconductoras característica, denominada como “respuesta H” (H de *Headache*) no presente en los sujetos sin migrañas. En sujetos sin migraña, la respuesta fotoconductoras observada en la corteza occipital en respuesta a la estimulación lumínica intermitente no aparece por encima de un rango de frecuencias (15-20Hz) como sí lo hace en los pacientes con migraña (*Golla et al, 1995; Chorlton et al, 2000*). Aunque se ha especulado que esta respuesta podría ser consecuencia de una hiperexcitabilidad de la corteza occipital, al menos sería indicativo de la existencia de diferencias fisiológicas en la corteza occipital en los pacientes con migraña.

I-3.5 Depresión cortical propagada

La Depresión Cortical Propagada (DCP) es una onda de despolarización neuronal y glial que una vez iniciada se propaga centrífugamente por la corteza cerebral. La DCP se inicia con un breve periodo de incremento en la excitación

neuronal, que a modo de un frente se propaga lentamente a una velocidad de 3-5mm/min. produciendo después una despolarización neuronal y glial masiva y mantenida de alrededor de 15 minutos. Durante este periodo no se observa actividad neuronal espontánea ni evocada. La recuperación de la función cortical normal ocurre de manera espontánea (*Leao, 1944; Martins-Ferreira et al, 2000*).

La DCP puede ser producida en modelos animales de experimentación *in Vitro* en la corteza cerebral humana mediante un incremento de la concentración extracelular de potasio o de glutamato, o con la aplicación de fármacos agonistas glutamatérgicos, además de ser facilitada por la disminución de la concentración extracelular de magnesio que actúa como ión compuerta del receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA). Por el contrario, se dificulta la generación de la DCP con la aplicación de fármacos antagonistas de los receptores NMDA (*Lauritzen, 1994; Martins-Ferreira et al, 2000; Gorji et al, 2001; Petzold et al, 2005*).

Se ha demostrado en animales de experimentación que el tratamiento crónico con los fármacos utilizados en el tratamiento preventivo de la migraña (propranolol, amitriptilina, valproato y topiramato) dificultan o aumentan el umbral para la generación de la DCP en el córtex, de manera que es preciso aumentar la concentración de potasio aplicado sobre la corteza cerebral para inducir la DCP. El efecto de los fármacos estudiados para suprimir la generación de la DCP era dosis dependiente y, al igual que ocurre en la práctica clínica, era también dependiente de la duración del tratamiento (*Ayata et al, 2006*).

I-3.6 Relación entre la DCP y el aura migrañosa

Son numerosas las evidencias clínicas y experimentales que establecen la DCP como el sustrato fisiopatológico del aura en la migraña y aunque la relación no está definitivamente establecida es el mejor modelo del que se dispone en la actualidad (*Charles et al, 2009*).

En 1941 Lashley publicaba, en base a los detalles clínicos de su propia aura visual: *'Maps of the scotomas of ophthalmic migraine sketched at brief intervals during an attack suggest that a wave of intense excitation is propagated at a rate of about 3 mm. per min. across the visual cortex. This wave is followed by complete inhibition of activity, with recovery progressing at the same rate'* (Lashley, 1941). Pocos años después, Leao publicaba los primeros estudios sobre la DCP (Leao, 1944). Fue Milner quién, en base a las similitudes y características de ambos procesos, establecía una lógica correlación entre el aura visual en humanos y el fenómeno de la DCP descrita en animales de experimentación (Milner, 1959).

En los últimos diez años hay numerosos estudios de neuroimagen que demuestran de una manera indirecta que el fenómeno de la DCP sería el mecanismo subyacente al aura visual que precede a la cefalea migrañosa (Bowyer et al, 2001; Sánchez del Río et al, 2004; Schwedt et al, 2009).

Hadjikhani et al., mediante **RM funcional**, analizando los cambios en la señal BOLD (*Blood-oxygen-level dependent*) que ocurren al comienzo del aura visual, observaron inicialmente un incremento en la señal BOLD focal en la corteza visual extraestriada (el incremento se produce por un aumento del flujo sanguíneo local y un cambio en el balance entre oxihemoglobina y deoxihemoglobina), hiperhemia que duraba 3-4,5 minutos y que se propagaban de forma centrífuga por el córtex occipital a una velocidad de 3-5mm/min., con una correspondencia retinotópica con el aura clínicamente descrita por los pacientes, dejando posteriormente una disminución de la señal o hipoperfusión durante 1-2 horas (Hadjikhani et al, 2001).

Durante el aura visual, mediante **RM perfusión**, también se ha demostrado una hipoperfusión en la corteza occipital, oligohemia relativa que se encuentra por encima del umbral para producir daño isquémico (Cutrer et al, 1998).

También en pacientes con MSA se producen cambios en la perfusión en la corteza occipital en los instantes iniciales de un ataque de migraña que podrían ser indicativos de DCP silente o subclínica (Woods et al, 1994; Denuelle et al, 2008).

Estudios mediante **magnetoencefalografía** ponen también de manifiesto cambios en los potenciales celulares durante el aura visual indicativos de la DCP (*Bowyer et al, 2001*).

I-3.7 Relación entre la DCP y la activación del sistema trigéminovascular

Se ha documentado cómo la inducción de la DCP en la corteza occipital en animales de experimentación puede activar los nociceptores menínges y secuencialmente sus proyecciones centrales en el núcleo espinal del trigémino (*Moskowitz et al, 1993; Ramagopalan et al, 2007; Zhang et al, 2011*), implicando posteriormente diferentes núcleos troncoencefálicos y áreas cerebrales que mediarían en la percepción y procesamiento del dolor y, en última instancia, en la génesis de la cefalea característica de la migraña (*Sánchez del Río et al, 2004*).

Los axones de los nociceptores menínges se extiende por la superficie pial de la corteza cerebral, donde pueden ser estimulados por el incremento de potasio extracelular producido durante la despolarización neuronal y glial, además de otros cambios ocurridos, como el aumento de el óxido nítrico (ON), un mensajero celular que difunde con facilidad. Se ha demostrado que la concentración de ON aumenta localmente, posiblemente debido a la entrada de calcio en la neurona durante la DCP que activaría la enzima óxido nítrico sintetasa neuronal (nONS) dependiente de calciocalmodulina (*Obrenovitch et al, 2002; Shen et al, 1999; Wang et al, 2003*). El ON es capaz de incrementar el flujo sanguíneo en las arterias menínges directamente o a través de la liberación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC) desde las terminales aferentes de las fibras trigeminales. Otros péptidos vasodilatadores, como la sustancia P (SP) y la neurokinina A (NKA), también presentes en las neuronas del ganglio trigeminal, serían responsables de la vasodilatación y extravasación de proteínas plasmáticas (Inflamación Neurógena) en los vasos sanguíneos menínges y piales (*Reuter et al, 2001; Strecker et al, 2002*).

Aunque existe documentada evidencia en animales de experimentación sobre la **Inflamación Neurógena**, no es posible demostrar este proceso en seres humanos de forma directa, pero existen estudios que demuestran que en la fase aguda de la migraña aumentan en la vena yugular interna ipsilateral a la cefalea las concentraciones de los metabolitos del ON y de los péptidos vasoactivos implicados (NKA, GRCP, SP) (*Ferrari et al, 1990*), así como la concentración de glutamato (*Sarchielli et al, 2000*).

La DCP no sólo produciría efectos proinflamatorios inmediatos, sino que a través de la activación de segundos mensajeros daría lugar a una cascada de señales que modificarían la expresión génica de neuronas y astrocitos. Se ha especulado que de esta manera, la DCP podría estar implicada en fenómenos de neuroprotección (*Shen P.J. et al, 1999; Wiggins et al, 2003; Yanamoto et al, 2004*).

I-4. LA CORTEZA CEREBRAL

I-4.1 Relación neurona-glía en el neocórtex.

Las diferencias citoarquitecturales de las seis capas en las que está constituido el neocórtex permiten establecer diferentes áreas desde el punto de vista histológico.

En la corteza cerebral humana, en el área 17 de Brodmann (corresponde con la corteza visual primaria) la densidad celular es de aproximadamente 67.400 células/mm³ en adultos, similar a la encontrada en el área 18 de Brodmann (aproximadamente de 63.700 células/mm³). Sin embargo, existen importantes diferencias en el ratio neurona/glía entre ambas áreas, siendo de 1,5 en el área 17 (es decir, unas 3 neuronas por cada 2 células gliales) y de aproximadamente 1 en el área 18 (unas 3 neuronas por cada 3 células gliales) (*Leuba et al, 1989*).

Uno de los cambios ocurridos en la evolución filogenética del córtex cerebral es la disminución del ratio neurona/glía, es decir, aunque ha aumentado el número de neuronas, el incremento ha sido relativamente mayor en el número de astrocitos, debido principalmente al incremento del neuropilo, pero muy probablemente también debido a la mayor eficiencia energética que supone el incremento proporcionalmente mayor en el número de astrocitos respecto al de neuronas (*Sherwood et al, 2006*). De hecho, en la corteza prefrontal medial, en el área 32 de Brodmann, la relación neurona/glía es aproximadamente de 0,6 (unas 3 neuronas por cada 5 células gliales) (*Sherwood et al, 2006*). Aunque anecdótico, es interesante mencionar que en el cerebro de Albert Einstein el ratio neurona/glía en el área de asociación temporoparietal era significativamente menor (debido a un incremento de las células gliales) respecto a los controles (*Diamond et al, 1985*).

La corteza cerebral contiene los cuerpos celulares de las neuronas y de las células gliales, especialmente de los astrocitos y, en mucha menor medida, oligodendrocitos y microglía (*Kandel, 2004*).

Tradicionalmente los astrocitos han sido considerados como los responsables de constituir la barrera hematoencefálica y regular su funcionamiento, además de ser el andamiaje y soporte donde se disponían las neuronas. En la actualidad, se sabe que la función de los astrocitos es mucho más compleja. Los astrocitos regulan y modulan la neurotransmisión entre neuronas, siendo una parte activa y fundamental de la sinapsis. Son responsables de metabolismo neuronal, aportando los sustratos metabólicos necesarios. Mantienen la homeostasis extracelular, regulando el pH, manteniendo niveles bajos de glutamato, controlando la concentración extracelular de potasio y el volumen del espacio intersticial. A través de su conexión con el endotelio vascular, los astrocitos además regulan activamente el flujo sanguíneo local (Nedergaard *et al*, 2003; Perea *et al*, 2009).

I-4.2 Ciclo Glutamato-glutamina

El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitador en la corteza cerebral. El mantenimiento de la neurotransmisión glutamatérgica supone gran parte del consumo energético de la sustancia gris cerebral (Escartin *et al*, 2006).

El Glu liberado en la terminal sináptica es rápida y eficazmente recaptado por el astrocito mediante el transportador de glutamato EAAT2 (*excitatory amino acid transporter*). En el astrocito, el glutamato se metaboliza a glutamina (Gln) mediante la enzima glutamina sintetasa. Finalmente la glutamina generada en el astrocito, difunde a la neurona presináptica donde se metaboliza de nuevo a Glu. Por lo tanto, existe una clara compartimentalización para Glu y Gln (**Figura 2**). Es decir, el **glutamato** se encuentra principalmente en el interior de las neuronas, mientras que la **glutamina** lo está en los astrocitos.

Mediante técnicas de espectroscopía por resonancia magnética con sustratos metabólicos marcados con isótopos radiactivos en un determinado átomo de carbono hay varias publicaciones en la última década que han cuantificado *in vivo* en sujetos

sanos el ciclo glutamato-glutamina. Se ha estimado que la concentración de Glu es 500 veces mayor en la neurona (10-15 mM) respecto a la del astrocito, y que la concentración de Gln es 5 veces mayor en el astrocito (5mM) en relación con la hallada en la neurona. La concentración de Glu en el espacio sináptico debe mantenerse a niveles muy bajos (1-3 μ M) para asegurar una adecuada neurotransmisión y evitar los efectos excitotóxicos del glutamato sobre las neuronas (Shen J. et al, 1999; Hansson et al, 2000; Kvamme et al, 2000; Petroff et al, 2002; Deitmer et al, 2003; Escartin et al, 2006).

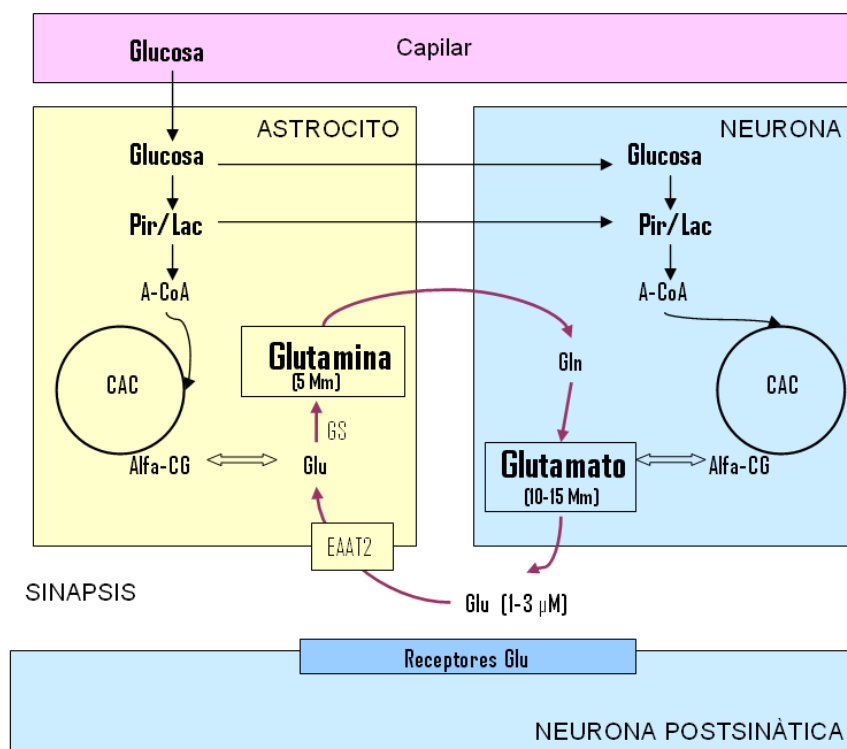


Figura 2. Ciclo glutamato-glutamina. Acoplamiento metabólico entre la neurona y el astrocito.

Después de la liberación de Glutamato (Glu) por la neurona presináptica y tras mediar su efecto en la neurona postsináptica, Glu es rápidamente recaptado por el astrocito en menos de un milisegundo. En el astrocito, Glu se convierte en Glutamina (Gln) mediante la acción de la glutamina sintetasa (GS). Posteriormente, Gln es transportada hacia la neurona donde se transforma de nuevo en Glu por la acción de una enzima glutaminasa. El pool de alfa-cetoglutarato (alfa-CG) es dinámicamente equilibrado con el de Glu. EAAT-2 (*excitatory amino acid transporter*) transportadores de glutamato. Pir (piruvato). Lac (lactato). A-CoA (acetil conenzima-A). CAC (Ciclo ácido cítrico).

I-4.3 El astrocito y la DCP

La elevación de potasio o de glutamato en el espacio extracelular por encima de un umbral determinado podría ser el mecanismo final común por el que se podría inducir o facilitar el inicio de la DCP (*Charles et al, 2009*). Los astrocitos son una pieza clave, ya que son los responsables de mantener una adecuada homeostasis extracelular, manteniendo concentraciones bajas de glutamato y de potasio en el espacio sináptico. De hecho, cuando la función astrogliar se bloquea, disminuye significativamente el umbral para la generación de la DCP en la corteza cerebral *in vitro* (*Largo et al, 1997; Lian et al, 2004*).

I-5 ESTUDIOS DE ESPECTROSCOPÍA EN MIGRAÑA

I-5.1 Nociones básicas sobre espectroscopía por resonancia magnética

La espectroscopía por resonancia magnética (ERM) permite la cuantificación *in vivo* de determinados metabolitos. En base a las propiedades magnéticas del núcleo del hidrógeno (^1H) y del fósforo (^{31}P) se pueden obtener datos sobre la naturaleza y la concentración de los metabolitos en un determinado tejido. La intensidad de señal (o amplitud) de cada resonancia (o pico espectral) viene expresada por el área bajo el pico y es una función del número relativo de átomos que constituyen el pico. De forma convencional, las frecuencias de resonancia se describen en partes por millón (ppm).

El espectro protónico o del núcleo del hidrógeno localizado por RM muestra tres resonancias principales: la primera, a 3,2 ppm, proveniente fundamentalmente de los fosfolípidos que contienen colina (Cho), compuestos considerados como marcadores del *turnover* de las membranas celulares; la segunda, a 3,0 ppm, proviene de la creatina (Cr), sola o como fosfocreatina, considerados como marcadores del metabolismo energético; y la tercera, a 2,0 ppm, proviene de los grupos N-acetilos, especialmente de N-acetil aspartato (NAA), marcador de la integridad neuronal (*Rudkin et al, 2004*).

La concentración de Cr es relativamente constante a lo largo de todo el cerebro y tiende a ser resistente a los cambios, por lo que se suele utilizar como un estándar interno al que se normalizan las intensidades de otros metabolitos (*Rudkin et al, 2004*).

En el caso del estudio del glutamato y de la glutamina, debido a su baja relación señal-ruido (es decir, a que Glu y Gln están presentes a concentraciones bajas y su señal es fácilmente enmascarada por el ruido de fondo) y las limitaciones en la resolución espectral de la señal proveniente del glutamato y de la glutamina por su

proximidad y solapamiento, su cuantificación tendía a analizarse como una combinación de ambas (Glx) (Govindaraju *et al*, 2000).

Actualmente, en la práctica clínica, se utilizan imanes con intensidades de campo de 1,5 Teslas. El elemento principal de un equipo de RM es el imán capaz de generar un campo magnético constante de gran intensidad. La intensidad del campo es importante, pues a mayor Teslas (T), se obtiene una mejor relación señal/ruido y mejor separación de los picos de espectroscopía. Por lo tanto, los equipos de RM más modernos y sofisticados, con imanes más potentes (3 Teslas) y empleando tiempos de eco (TE) cortos permiten una mejor determinación y cuantificación del espectro tanto del glutamato como de la glutamina.

Para determinar la posición y dimensión de los volúmenes espectroscópicos, es decir, cuál y cuánto tejido se analizará, existen dos modalidades:

1) La espectroscopía de volumen único (*single voxel localization*), donde la localización del volumen a estudiar está determinada por la intersección de tres planos ortogonales. La imagen obtenida al usar un vóxel único es más rápida, sensible y específica.

2) La imagen espectroscópica con técnicas multi-vóxel, obtiene la información de áreas cerebrales más extensas, que al subdividirse permiten obtener el espectro individual de cada volumen

A la hora de realizar estudios de ERM se debe tener en cuenta las diferencias regionales en las concentraciones de metabolitos, incluyendo las diferencias propias entre la sustancia blanca y gris, así como las diferencias propias de cada región anatómica. Por ello, la comparación de un vóxel en la región de interés se hace típicamente con un vóxel en el hemisferio contralateral (Rudkin *et al*, 2004).

I-5.2 Estudios ERM del núcleo del hidrógeno en la migraña

Los estudios realizados en pacientes con migraña con ERM del protón del hidrógeno muestran resultados dispares y poco concluyentes (*Watanabe et al, 1996; Sandor et al, 2005; Sarchielli et al, 2005; Schulz et al, 2007; Prescott et al, 2009; Reyngoudt et al, 2011b*).

En el estudio realizado por Schulz *et al.*, no se encontraron diferencias significativas en los ratios analizados (NAA/Cr, Cho/Cr y NAA/Cho) entre los pacientes con migraña y los controles (*Schulz et al, 2007*). Prescott *et al.*, empleando una RM craneal de 4 Teslas, demostraron mediante un análisis de discriminación lineal una clara separación entre NAAG (dipéptido formado por la unión de Glu y NAA) y Gln indicativo de anormalidades en el sistema glutamatérgico durante el periodo interictal en pacientes con migraña respecto a controles. Este estudio centró la región de interés en el cíngulo anterior por considerarlo implicado en el procesamiento emocional del dolor (*Prescott et al, 2009*).

Otros estudios han centrado su interés principalmente en el lóbulo occipital. Inicialmente, Watanabe *et al.* describieron un incremento en las concentraciones de lactato en la corteza occipital (CO) en los pacientes con migrañas con aura durante el periodo interictal. Sin embargo, este estudio fue realizado con un tamaño muestra muy bajo (n=5) (*Watanabe et al, 1996*). Posteriormente, Sandor *et al.* cuantificaron mediante ERM diferentes metabolitos en la CO durante la estimulación lumínica, demostrando que en los pacientes con migraña con aura existía un incremento en el lactato durante el periodo interictal, pero que este no se incrementaba durante la estimulación (*Sandor et al, 2005*). Un abordaje similar fue empleado por Sarchielli *et al.*, quienes demostraron una disminución en la señal de NAA después de la estimulación fónica y un ligero incremento en el pico de lactato en pacientes con migraña con aura respecto a pacientes con migraña sin aura y controles (*Sarchielli et al, 2005*). Un estudio más reciente, limitado a pacientes con migraña sin aura, no

demostró incrementos de lactato en el lóbulo occipital tanto en el periodo interictal como después de la estimulación fótica (*Reyngoudt et al, 2011b*).

No existe hasta el momento ningún estudio que haya analizado la concentración de glutamato, glutamina o el ratio Glu/Gln en sujetos con migraña en la región occipital.

I-5.3 Estudios ERM del núcleo del fósforo en la migraña

En varios estudios llevados a cabo mediante ERM del núcleo del fósforo se ha documentado una disminución en los compuestos fosforados de alta energía en los pacientes con migrañas en el periodo interictal respecto a controles, datos que se han intentado correlacionar con una posible disfunción mitocondrial, una menor reserva energética o con un mayor consumo energético en el contexto de una posible hiperexcitabilidad cortical en los pacientes con migrañas, principalmente en el lóbulo occipital (*Welch, 1989; Schulz et al, 2007; Reyngoudt et al, 2011a*).

II- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II-1. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

Aunque se desconoce el motivo por el que un individuo presenta una susceptibilidad a padecer migrañas, si la elevación de glutamato y de potasio por encima de un umbral determinado es el proceso final que inicia y pone en marcha la DCP, y este proceso es el sustrato fisiopatológico más ampliamente estudiado en la migraña (*Charles et al, 2009*), es posible plantear que éste fenómeno ocurriera en sujetos con un **mayor ratio neurona/astrocito en la corteza occipital** (lugar del córtex donde se encuentra la mayor densidad neuronal) en respuesta a determinados desencadenantes (estrés, cambios hormonales en la mujer, etc.) (*Lauritzen, 1994; Pascual, 2009*).

Basándonos en la existencia de una clara compartimentalización del Glu (su concentración es mucho mayor en las neuronas) y de la Gln (cuya concentración es mayor en el astrocito), planteamos la determinación del ratio de Glu/Gln mediante ERM-1H como una estimación indirecta del ratio neurona/astrocito. Consideramos que un mayor ratio de Glu/Gln en la corteza occipital, en los pacientes con migrañas respecto a sujetos control, podría ser un indicador de una mayor dificultad para el mantenimiento de una adecuada homeostasis de la neurotransmisión glutamatérgica y, en última instancia, una predisposición para padecer migrañas ante determinados factores desencadenantes.

II-2. OBJETIVOS

Primarios:

1) Determinar mediante espectroscopía por resonancia magnética del núcleo del hidrógeno (ERM-1H) si existe una diferencia significativa en el ratio Glu/Gln en la corteza occipital (CO) en pacientes con el diagnóstico de migraña respecto a sujetos control.

2) Determinar mediante ERM-1H si existe una diferencia significativa en el ratio Glu/Gln limitada a CO, o si por el contrario las diferencias son extensibles a la corteza prefrontal medial (CPM) en pacientes con el diagnóstico de migraña respecto a sujetos control.

Secundarios:

A) Determinar mediante ERM-1H si existen diferencias significativas en la concentración de Glu y Gln, en CO y en CPM, en pacientes con el diagnóstico de migraña respecto a sujetos control.

B) Determinar mediante ERM-1H si existen diferencias significativas en los ratio NAA/Cr, Cho/Cr, Glu/Cr y Gln/Cr, tanto en CO como en CPM, en pacientes con el diagnóstico de migraña respecto a sujetos control.

C) Determinar mediante ERM-1H si existen diferencias significativas en los ratio NAA/Cr, Cho/Cr, Glu/Cr, Gln/Cr y Glu/Gln, tanto en CO como en CPM, en pacientes con el diagnóstico de migraña con aura, migraña sin aura y en sujetos control.

E) Determinar si en los pacientes con migrañas existe, tanto en CO como CPM, una correlación en el ratio Glu/Gln en función de la frecuencia de los ataques.

F) Determinar si en los pacientes con migrañas y en sujetos control existe, tanto en CO como en CPM, relación entre el ratio Glu/Gln y la edad.

III- MATERIAL Y MÉTODOS

III- MATERIAL Y MÉTODOS

III-1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio observacional de casos y controles.

Los pacientes han sido seleccionados de manera consecutiva en las consultas de Neurología Ambulatoria en los Centro de especialidades de Aguacate y Villaverde pertenecientes al Hospital 12 de Octubre.

Los controles fueron voluntarios sanos del área de estudio que respondieron a la solicitud.

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación del Hospital 12 de Octubre.

III-2. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

Criterios de inclusión:

- 1)- Mujeres de 18-45 años de edad con el diagnóstico de migraña sin aura o migraña con aura típica, de acuerdo con los criterios establecidos en la segunda edición de la ICHD-2 (*International Classification of Headache Disorders*).
- 2)- Para conseguir un grupo homogéneo de pacientes, se seleccionaron únicamente mujeres, con frecuentes episodios de migraña (más de dos ataques al mes en los tres meses previos) y una historia de migrañas de al menos tres años.
- 3)- Obtención del consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- 1)- Pacientes en tratamiento con fármacos preventivos para la migraña, antidepresivos, narcóticos, antiepilépticos, estabilizadores del ánimo o ansiolíticos.
- 2)- Pacientes con comorbilidad neurológica o psiquiátrica.
- 3)- Pacientes con el diagnóstico de migraña crónica con abuso de analgésicos.
- 4)- Contraindicación para la realización de una RM craneal.

III-3. SELECCIÓN DE LOS CONTROLES

Criterios de inclusión:

- 1)- Mujeres sin migraña apareadas por edad.
- 2)- Obtención del consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- 1)- Mujeres en tratamiento con fármacos (antidepresivos, narcóticos, antiepilépticos, estabilizadores del ánimo o ansiolíticos).
- 2)- Mujeres con morbilidad neurológica (excluyendo la cefalea tensional episódica) o psiquiátrica
- 3)- Historia de migrañas en familiares en primer grado de parentesco.
- 4)- Contraindicación para la realización de una RM craneal.

III-4. RESONANCIA MÁGNETICA (Adquisición de datos)

Los estudio de neuroimagen se realizaron en el Departamento de Neuroimagen de la Fundación CIEN (Centro Investigación Enfermedades Neurológicas), mediante una RM craneal de 3 Teslas (GE Signa 3T HDxt scanner, General Electric Medical Systems). Se utilizó una antena de cabeza de 8 canales.

Con el objetivo de excluir posible patología subyacente se realizaron secuencias potenciadas en T2 con técnica de eco planar spin eco (TR/TE, 2500/66 mseg; matriz de 256X256; cortes de 4mm de grosor y 2 excitaciones).

Se obtuvieron secuencias volumétricas 3D potenciadas en T1 con técnica de inversión recuperación para guiar la colocación de los vóxeles de espectroscopía (SPGR, TR/TE/TI, 7/3/750 mseg; matrix 288X288; ángulo de 12°; asset 2; 1mm de grosor y 1 excitación).

La ERM-H1 de volumen único (*single voxel localization*) se realizó a todos los pacientes utilizando la secuencia Probe-P con supresión de agua, tiempo de repetición (TR) de 2000 mseg, tiempo de eco (TE) de 28mseg y 8 excitaciones. El tiempo de adquisición fue de 368 segundos.

En cada paciente se utilizaron 2 vóxeles, situado uno en la corteza prefrontal medial de 20×20×20 mm³ y otro en la corteza occipital de 30×30×30 mm³ (**Figura 3**). La localización elegida en ambos vóxeles vino determinada por el propósito de obtener la máxima cantidad de sustancia gris y minimizar en la medida de lo posible la contribución del LCR y la sustancia blanca. El vóxel correspondiente a la CO fue situado utilizando como referencia el surco calcarino, de manera que se cubriera la mayor cantidad posible de corteza visual primaria y secundaria (correspondientes a las áreas 17 y 18 de Brodmann) (**Figura 4**).

Los estudios de RM craneal y el análisis post-adquisición fueron realizados por un neuroradiólogo y un físico respectivamente, quienes desconocían el diagnóstico clínico del sujeto.

Los estudios se realizaron al menos 24 horas después de un ataque de migraña.

Todos los participantes recibieron la instrucción de permanecer relajados y con los ojos cerrados durante la realización de la RM craneal.

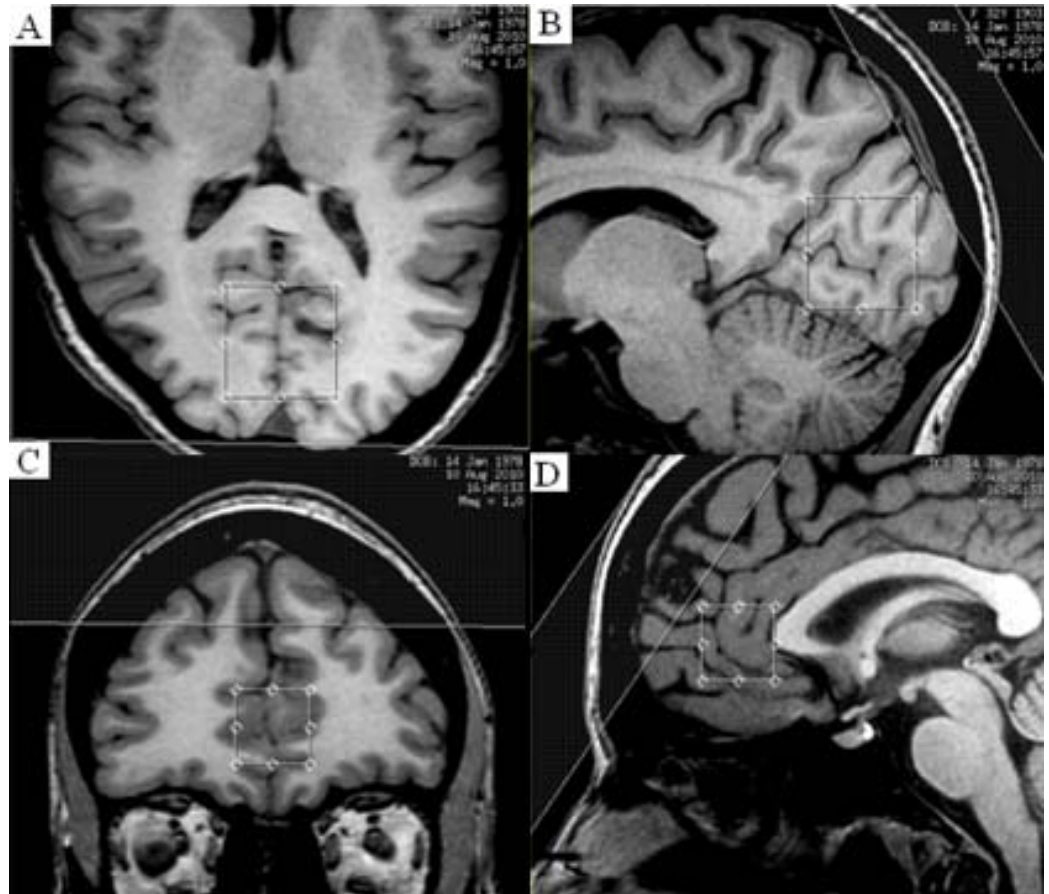


Figura 3. Imágenes de RM craneal axial y sagital ponderadas en T1. Localización de los vóxeles empleados para el estudio de ERM-H1 en la corteza occipital (A y B) y en la corteza prefrontal medial (C y D).

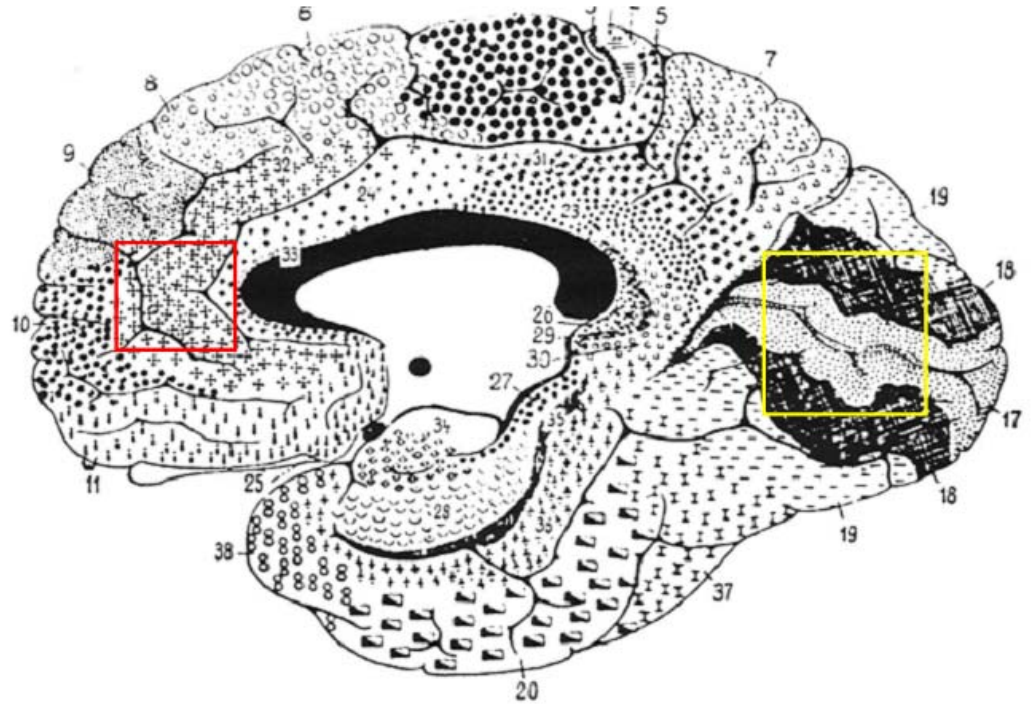


Figura 4. Superposición de la localización del vóxel empleado para el estudio de ERM-H1 en la corteza occipital (en amarillo) y en la corteza prefrontal medial (en rojo) con las áreas citoarquitectónicas detalladas por Brodmann.

III-5. ESPECTROSCOPIA RESONANCIA MAGNÉTICA

(análisis post-adquisición).

Una vez obtenido el volumen de interés en CO y CPM (vóxel simple) las imágenes de RM fueron segmentadas (*vóxel-based morphometry, open-source software statistical parametric mapping* [SPM8]). En cada uno de los vóxeles se cuantificó el porcentaje correspondiente de sustancia gris, sustancia blanca y líquido cefalorraquídeo. Para ello se empleó un software desarrollado con MATLAB (*The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA*) en el departamento de neuroimagen de la Fundación CIEN (*Ashburner et al, 1997; Ashburner et al, 2000*).

Mediante LCModel® se determinaron las concentraciones absolutas de NAA (N-acetil aspartato+N-acetil aspartaril glutamato), Cr (Creatina+ fosfocreatina), Cho (colina+fosfocolina), Glu (glutamato) y Gln (glutamina) (**Figura 5**).

LCModel® es un paquete comercial de software que permite obtener *in vivo* un análisis espectral de diferentes metabolitos utilizando dominios de frecuencias comparables para determinadas condiciones de escaneo (*Provencher, 1993*).

LCModel® determina la concentración absoluta para cada metabolito y su porcentaje de desviación estándar (%SD) que es una estimación de la exactitud de la medición (también conocido como *Cramer–Rao lower bounds* [CRLBs]).

La cuantificación de Gln es difícil debido a las limitaciones del análisis espectral ya que su concentración es relativamente baja y existe un solapamiento con la señal de Glu (*Govindaraju et al, 2000*). Debido a que nuestra hipótesis se basaba en la cuantificación de Glu y Gln para determinar el ratio Glu/Gln, los CRLBs de glutamina fueron utilizados para determinar aquellas determinaciones que pudieran constituir una cuantificación errónea. Para ello, basándonos en una regla de detección de valores anómalos o extremos mediante un diagrama de caja (*Box Plot*), no se tuvieron en cuenta los estudios de espectroscopía H1-MRS donde el valor de CRLBs

de Gln se encontrara a una distancia superior a 1,5 veces la amplitud intercuartil (H1-H3).

La cuantificación de los metabolitos se expresó respecto a un estándar de referencia interno como es Cr (NAA/Cr, Cho/Cr, Glu/Cr y Gln/Cr).

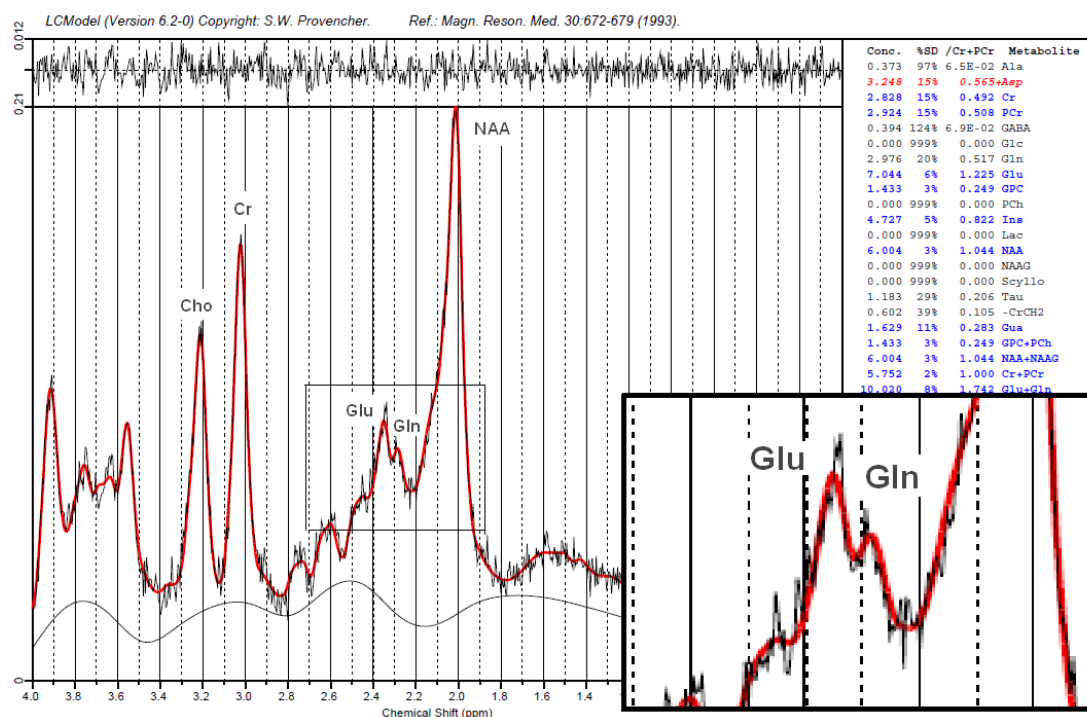


Figura 5. Imagen representativa del espectro obtenido en región occipital en un paciente con migrañas. Imagen de espectroscopía normalizada utilizando el software LCModel®. La parte superior de la derecha muestra la concentración estimada para los metabolitos determinados, el grado de exactitud de la medición (SD%) y el ratio respecto a Creatina + fosfocreatina. En la parte inferior y derecha se ha ampliado la zona correspondiente a los picos de Glutamato y Glutamina. Cho (colina + fosfocolina), Cr (Creatina + fosfocreatina), Glu (glutamato), Gln (glutamina) y NAA (N-acetil aspartato+N-acetil aspartaril glutamato).

III-6. RECOGIDA DE DATOS

Se diseñó una base de datos con Excel 2003 para la recogida y posterior importación y procesamiento de los resultados mediante SPSS. Se recogieron las siguientes variables: datos de filiación, número de ataques de migraña al mes en los tres meses previos (promedio estimado por el paciente), fecha de nacimiento y fecha de realización del estudio.

III-7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Estadística descriptiva:

Se obtuvo una descripción general de las distintas variables del análisis. Para aquellas variables cualitativas: distribución de frecuencia absoluta y porcentaje. Para las variables cuantitativas: medidas de tendencia central, media o mediana, acompañadas de las medidas de dispersión, desviación estándar o rango intercuartílico. Para la representación gráfica de las variables cuantitativas (ratio Glu/Gln y concentración de Gln) se utilizó un diagrama de cajas (*Box Plot*) o un diagrama de tallo y hojas (SD% glutamina)

Estadística analítica:

Para estudiar la relación entre variables no numéricas, se realizaron tests de la Chi cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher (tablas 2x2 poco pobladas).

Para la comparación de las variables numéricas entre los pacientes con migraña y los controles se realizó el test de comparación de medias t-Student (prueba bilateral) para muestras independientes. Puesto que los grupos estudiados tenían menos de 30 casos, antes de la aplicación de la prueba t de Student se valoró el supuesto de

normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y el supuesto de igualdad de variancias (prueba de Levene) de las variables numéricas. La prueba t de Student se aplicó cuando se comparó las siguientes variables cuantitativas: la edad; el volumen de sustancia blanca o sustancia gris en los vóxeles estudiados; los valores de Gln SD%; la comparación entre los ratios de Glu/Gln, NAA/Cr, Cho/Cr, Glu/Cr y Gln/Cr; y la comparación entre las concentraciones de Glu y Gln.

Para la comparación de variables numéricas entre más de dos grupos (MCA, MSA y controles) se realizó un análisis de la varianza, o en su defecto, la prueba no paramétrica de Kruskal-wallis. Si las medias de las variables analizadas mostraron diferencias significativas, se realizó un contraste “*a posteriori*” mediante el test no paramétrico de Games-Howell, asumiendo la no igualdad de varianzas y la diferencia en el tamaño muestral entre los tres grupos.

Para analizar la relación entre el ratio Glu/Gln en función de la edad o de la frecuencia de los ataques de migraña, se realizó un modelo lineal de regresión o un cálculo de la correlación de Pearson, en función de la relación entre las variables analizadas.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05.

Los datos fueron analizados con el programa SPSS (versión 15.0; *Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, IL, USA).

IV- RESULTADOS

IV- RESULTADOS

Veinticuatro mujeres sanas y 32 mujeres con migrañas fueron incluidas en el estudio. De los 32 pacientes incluidos, en uno de los casos no se realizó el estudio de espectroscopía RM por detectarse en el estudio RM hallazgos patológicos en la región frontal (se estableció posteriormente el diagnóstico de glioma frontal de bajo grado). La paciente presentaba migrañas sin aura desde los 12 años de edad, la exploración neurológica era normal y el hallazgo observado en neuroimagen no guardaba relación con el diagnóstico de migraña.

IV-1. VALORACIÓN DE LA EXACTITUD DE LAS MEDICIONES REALIZADAS

Se determinaron los **valores anómalos o extremos** mediante un diagrama de caja (*Box Plot*) para los valores de CRLBs (SD%) de Gln. Para una mejor visualización se presentan mediante un diagrama de tallo y hoja (**Figura 6**). De los 31 pacientes y 24 controles analizados, se observaron valores extremos (se encontraron a una distancia superior a 1,5 veces la amplitud intercuartil [H1-H3]) en 4 pacientes (12,9%) y en 5 controles (20,8%) ($p=0,48$).

Los valores de Gln SD% excluidos fueron de 190% (un estudio), 737% (un estudio) y 999% (7 estudios).

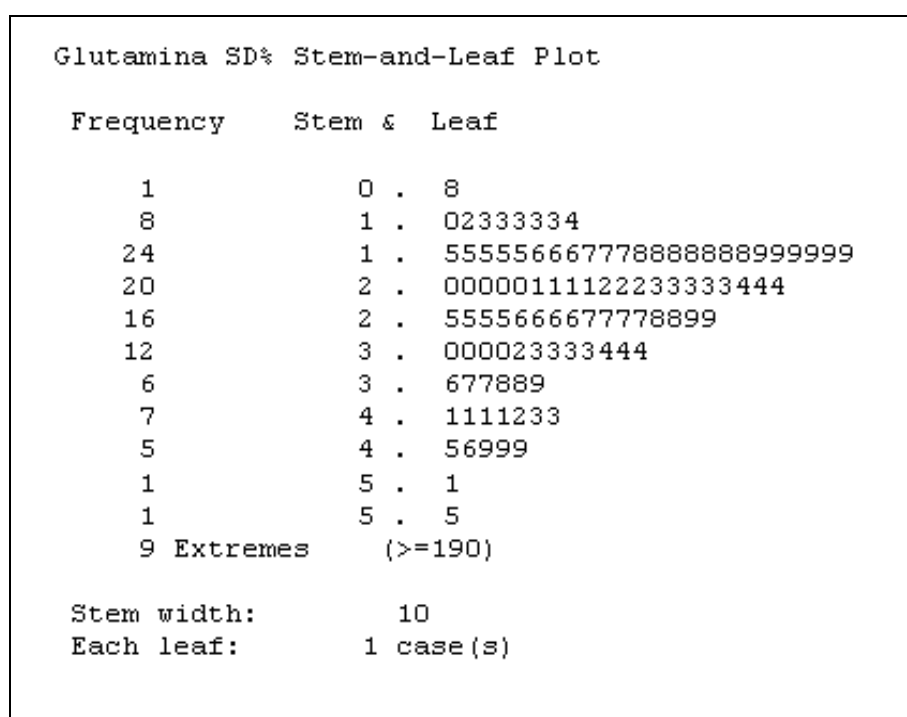


Figura 6. Diagrama de tallo y hoja (*Stem & leaf*) de los valores de glutamina SD% de todos los estudios de espectroscopía realizados, tanto en corteza occipital como en corteza prefrontal medial, en 31 pacientes y 24 controles. La columna “*Stem*” indica la cifra de las decenas y la de “*Leaf*” la de las unidades de los valores de Gln SD% hallados. En la columna de la izquierda se especifica la frecuencia de cada uno de los valores de Gln SD%. Existen 9 **valores anómalos o extremos** (*Extremes*), el menor de ellos con un valor de Gln SD% de 190.

En el estudio final tuvimos en cuenta los resultados obtenidos en 27 pacientes y en 19 controles.

El análisis de espectroscopía de los metabolitos incluidos en el estudio (correspondientes a 27 pacientes y 19 controles) presentaba, en todos los casos, una SD% menor de 12% para el Glu, menor del 10% para Cho y menor del 6% para NAA y Cr.

En el caso de Gln SD%, en CO en pacientes con migraña y controles, la media Gln SD% fue de 34,1% (SD=19,18%) y de 25,1% (SD=9,29%) respectivamente ($p=0,063$). En el vóxel localizado en MPC en pacientes con migraña y controles, la media Gln SD% fue de 23,9% (SD=12,94%) y 22,2% (SD=6,74%) respectivamente ($p=0,648$).

Se muestran las concentraciones de glutamina obtenidas mediante LCModel® en pacientes con migraña y controles en CO (**Figura 7**) y en CPM (**Figura 8**), así como los valores estimados entre los que se encontraría con una probabilidad del 68% (media+desviación estándar) el valor teórico de glutamina en cada uno de los grupos estudiados. Para el cálculo de la desviación estándar en cada uno de los valores de glutamina obtenidos se empleó la siguiente fórmula: desviación estándar = media x (Gln SD% x 0,01).

CORTEZA OCCIPITAL

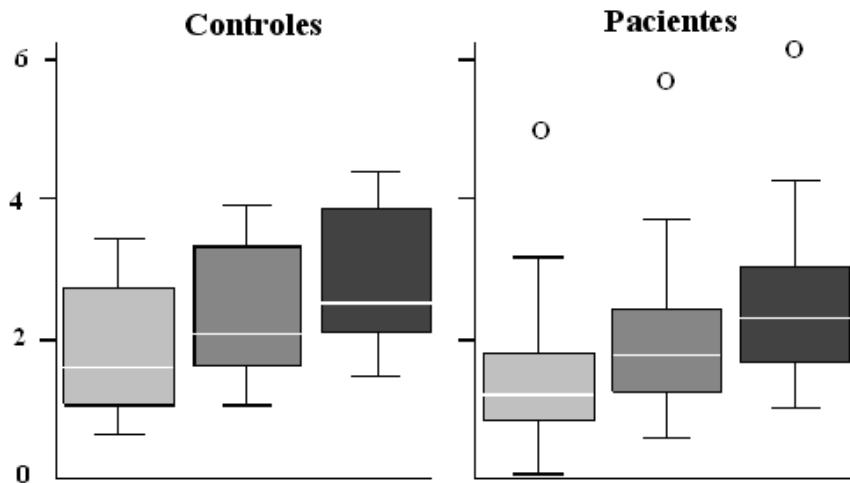


Figura 7. Diagrama de cajas (*Box Plot*). Concentración absoluta de **GLUTAMINA** en la corteza occipital en controles y en pacientes con migraña.

Se muestra el valor obtenido (caja central gris) y sus valores estimados:

-Caja situada a la izquierda en gris claro: media + desviación estándar

-Caja situada a la derecha en gris oscuro: media - desviación estándar

Desviación estándar = [media x (Gln SD% x 0,01)]

El diagrama está compuesto por un rectángulo, la "caja", y dos brazos, los "bigotes".

Las cajas están formadas por dos extremos que delimitan el rango intercuartílico (RIC) (Q1-Q3).

La línea blanca que divide la caja corresponde con la mediana de la distribución.

Los bigotes representan los valores que no se consideran anómalos o extremos: inferiores a $Q1 - 1.5 \times RIC$ o superiores a $Q3 + 1.5 \times RIC$ (representados por "O").

CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL

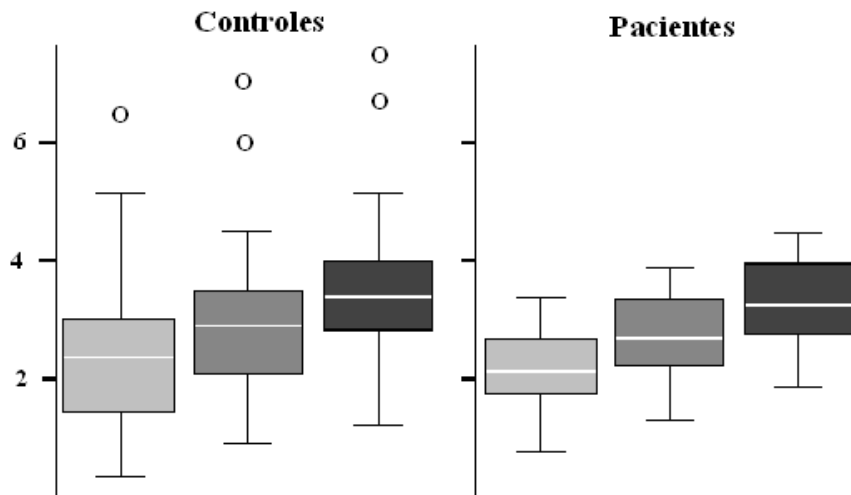


Figura 8. Concentración absoluta de **GLUTAMINA** en la corteza prefrontal medial en controles y en pacientes con migraña. Diagrama de cajas (*Box Plot*)

Se muestra el valor obtenido (caja central gris) y sus valores estimados:

-Caja situada a la izquierda en gris claro: media + desviación estándar

-Caja situada a la derecha en gris oscuro: media - desviación estándar

Desviación estándar = $[media \times (Gln\ SD\% \times 0,01)]$

El diagrama está compuesto por un rectángulo, la "caja", y dos brazos, los "bigotes".

Las cajas están formadas por dos extremos que delimitan el rango intercuartílico (RIC) (Q1-Q3).

La línea blanca que divide la caja corresponde con la mediana de la distribución.

Los bigotes representan los valores que no se consideran anómalos o extremos: inferiores a $Q1 - 1.5 \times RIC$ o superiores a $Q3 + 1.5 \times RIC$ (representados por "O").

IV-2. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS SUJETOS

La edad media de los pacientes fue de 31,75 años (SD=8 años), y de 31,79 años (SD= 4,5años) en el caso de los controles ($p=0,98$) (**Tabla 2**).

El número de ataques de migraña al mes en los tres meses previos a la realización del estudio de RM craneal fue de 3,15 (SD=1,29) (**Tabla 2**).

En los pacientes con MCA, los síntomas descritos eran los característicos del aura migrañosa típica. Todos los pacientes con MCA presentaban auras visuales (8/8), en dos pacientes (2/8) el aura visual se acompañaba de síntomas sensitivos y uno de los pacientes (1/8) en dos ocasiones había presentado disfasia junto con los síntomas visuales y sensitivos típicos. Ningún paciente presentaba déficit motor.

	Estudiados	Incluidos	Edad	Migrañas/mes
Pacientes	31	27	31,75 (8,0)	3,15 (1,29)
MCA	9	8	34,54 (5,5)	3,38 (1,41)
MSA	22	19	30,58 (8,7)	3,05 (1,29)
Controles	24	19	31,79 (4,5)	-

Tabla 2. Número de estudios realizados (primera columna). En la segunda columna se expresa el número de estudios incluidos en el análisis final, con la edad y el número de migrañas al mes (tercera y cuarta columna respectivamente). MCA (migraña con aura). MSA (migraña sin aura).

Los valores están expresados en: media (desviación estándar).

IV-3. RESULTADOS DE LA SEGMENTACIÓN DEL VÓXEL EN CO Y CPM

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el volumen de sustancia blanca y de sustancia gris incluida en el vóxel localizado en CO y en el vóxel localizado en CPM en pacientes respecto a controles (**Tabla 3**).

		Sustancia blanca	Sustancia gris
CPM	Control	1,46 (1,09)	5,71 (0,77)
	Migraña	1,41 (0,51)	5,78 (0,49)
CO	Control	8,34 (1,28)	16,99 (1,31)
	Migraña	8,33 (0,95)	17,36 (0,73)

Tabla 3. Volumen (cm³) de sustancia blanca y sustancia gris en el vóxel situado en CPM (corteza prefrontal media) de 8 cm³ y del vóxel situado en CO (corteza occipital) de 27 cm³ (el resto corresponde a líquido cefalorraquídeo).

Los valores están expresados en: media (desviación estándar).

IV-4. DETERMINACIONES EN LA CORTEZA OCCIPITAL

Análisis por grupos:

Se observó un mayor ratio Glu/Gln en CO (**Figura 9**) en pacientes con migraña respecto a los controles, siendo la diferencia observada de 1,45 (IC 95%: 0,52 a 2,85) y estadísticamente significativa ($p=0,042$) (**Tabla 4**). En el resto de las variables analizadas (NAA/Cr, Cho/Cr, Glu, Gln, Glu/Cr y Gln/Cr) no se observaron diferencias significativas (**Tabla 5**). La diferencia observada entre los pacientes con migraña y los controles en los niveles de glutamato fue de 0,52 (IC 95%: -0,31 a 1,35), de -0,41 (IC 95%: -1,03 a 0,2) en los niveles de glutamina y de -0,11 (IC 95%: -0,002 a 0,22) en el ratio de Gln/Cr.

	Glutamato	Glutamina	Glu/Gln
Control	6,681 (1,25)	2,321 (0,96)	3,419 (1,52) *
Migraña	7,203 (1,45)	1,908 (1,05)	4,870 (2,74) *

Tabla 4. Ratio glutamato/glutamina (Glu/Gln) y los valores absolutos de glutamato y glutamina en corteza occipital. Los valores están expresados en: media (desviación estándar). * ($p=0,043$).

	NAA/Cr	Cho/Cr	Glu/Cr	Gln/Cr
Control	1,484 (0,15)	0,146 (0,02)	1,137 (0,17)	0,409 (0,21)*
Migraña	1,463 (0,12)	0,153 (0,03)	1,140 (0,19)	0,297 (0,15)*

Tabla 5. Ratio NAA/Cr, Cho/Cr, Glu/Cr y Gln/Cr en corteza occipital. Los valores están expresados en: media (desviación estándar).* ($p=0,053$).

Análisis por subgrupos:

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,109$) en el ratio Glu/Gln en la CO cuando se realizó un análisis entre subgrupos (controles, MCA y MSA).

Tampoco en el resto de las variables analizadas (NAA/Cr, Cho/Cr, Glu/Cr y Gln/Cr) se observaron diferencias.

IV-5. DETERMINACIONES EN LA CORTEZA PREFRONTAL MEDIAL

Análisis por grupos:

Los niveles de Glu ($p=0,007$) y el ratio de Glu/Cr ($p=0,001$) fueron mayores en CPM en pacientes con migrañas respecto a los controles (**Tabla 6**) siendo la diferencia observada de 0,76 (IC95%: 0,21 a 1,3) y de 0,18 (IC 95%: 0,07 a 0,28) respectivamente. No se observaron diferencias significativas: 0,16 (IC 95% -0,64 a 0,97), en el ratio Glu/Gln en CPM (**Figura 9**).

En el resto de las variables analizadas (NAA/Cr, Cho/Cr, Gln, y Gln/Cr) tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 7**).

	Glutamato	Glutamina	Glu/Gln
Control	6,218 (0,97) *	3,058 (1,49)	2,625 (1,61)
Migraña	6,975 (0,85) *	2,738 (0,71)	2,789 (1,11)

Tabla 6. Ratio glutamato/glutamina (Glu/Gln) y los valores absolutos de glutamato y glutamina en la corteza prefrontal medial. Los valores están expresados en: media (desviación estándar). * ($p=0,007$)

	NAA/Cr	Cho/Cr	Glu/Cr	Gln/Cr
Control	1,074 (0,18)	0,276 (0,02)	1,002 (0,16) *	0,486 (0,23)
Migraña	1,124 (0,12)	0,279 (0,04)	1,181 (0,18) *	0,460 (0,12)

Tabla 7. Ratio NAA/Cr, Cho/Cr, Glu/Cr y Gln/Cr en corteza prefrontal medial. Los valores están expresados en: media (desviación estándar). * ($p=0,001$).

Análisis por subgrupos:

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,908$) en el ratio Glu/Gln en la CPM cuando se realizó un análisis entre subgrupos (controles, MCA y MSA).

Para el resto de las variables analizadas no se observaron diferencias (NAA/Cr, Cho/Cr, Gln y Gln/Cr), salvo para Glu/Cr ($F(2, 43) = 6.17, p=0.004$).

El análisis “*a posteriori*” de las medias de Glu/Cr mostró que no existían diferencias ($p=0,48$) entre MCA [1,229 (0,096)] y MSA [1,162 (0,204)]; pero ambas medias fueron estadísticamente superiores ($p=0,005$ y $p=0,035$) a la media de Glu/Cr: [1,002 (0,16)] observada en CPM en los sujetos control.

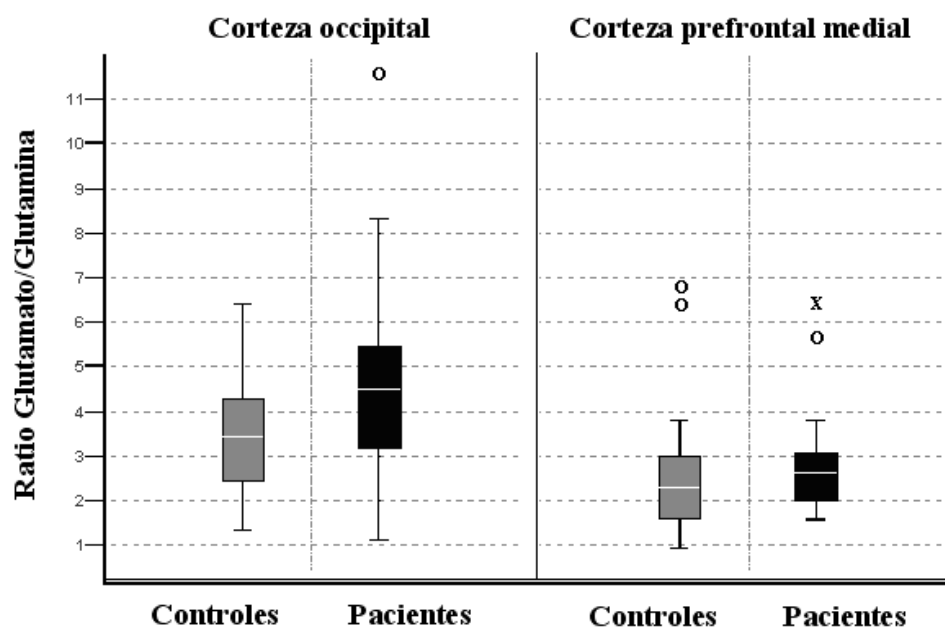


Figura 9. Diagrama de cajas (*Box Plot*) del ratio glutamato/glutamina (Glu/Gln) en pacientes (caja de color negro) y controles (gris), en la corteza occipital y en la corteza prefrontal medial.

El diagrama está compuesto por un rectángulo, la "caja", y dos brazos, los "bigotes".

Las cajas están formadas por dos extremos que delimitan el rango intercuartílico (RIC) (Q1-Q3). La línea blanca que divide la caja corresponde con la mediana de la distribución. Los bigotes representan los valores que no se consideran anómalos o extremos: inferiores a $Q1 - 1.5 \times RIC$ o superiores a $Q3 + 1.5 \times RIC$ (representados por "O"). Con el símbolo "X" se representan los valores considerados muy extremos ($Q3 + 3 \times RIC$).

IV-6. RELACIÓN ENTRE EL RATIO GLU/GLN EN FUNCIÓN DE LA FRECUENCIA DE LOS ATAQUES Y DE LA EDAD.

Relación entre Glu/Gln en función de la frecuencia de los ataques:

No se observó ninguna correlación entre el número de migrañas al mes y el ratio Glu/Gln en CO ($r=-0,266$; $p=0,18$) ni en CPM ($r=0,214$; $p=0,284$) en los pacientes con migrañas.

Relación entre Glu/Gln en función de la edad:

No se observó ninguna relación lineal entre la edad y el ratio Glu/Gln, realizando el análisis tanto en CO como en CPM, en mujeres control o en mujeres con migraña.

V- DISCUSIÓN

V- DISCUSIÓN

V-1. RESUMEN DE LOS RESULTADOS.

Consideramos que los principales resultados de nuestro estudio son el hallazgo de un mayor ratio Glu/Gln en la corteza occipital, junto con un mayor ratio Glu/Cr en la corteza prefrontal medial en las mujeres con migraña durante el periodo interictal en relación a los controles.

El número de pacientes incluido en cada uno de los grupos (migrañas y controles) fue adecuado para hallar diferencias estadísticamente significativas en el ratio Glu/Gln en CO, pero insuficiente si tenemos en cuenta el análisis por subgrupos (MCA, MSA y controles).

V-2. VALORACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

La cuantificación de la concentración de glutamato y glutamina en el cerebro pone de manifiesto una clara compartimentalización, de manera que la concentración de glutamato en las neuronas es de 10-15 mMolar mientras que en los astrocitos es prácticamente despreciable (50 μ M) y, por el contrario, la concentración de glutamina es unas cinco veces mayor en los astrocitos (3-5 mM) (*Shen J. et al, 1999; Hansson et al, 2000; Kvamme et al, 2000; Petroff et al, 2002; Deitmer et al, 2003; Escartin et al, 2006*).

El ratio neurona/glia es claramente mayor en la corteza occipital (1,5 en el área 17 y en 1,0 en el área 18 de Brodmann) (*Leuba et al, 1989*), respecto al estimado en la corteza prefrontal medial (aproximadamente 0,6 en el área 32 de Brodmann) (*Sherwood et al, 2006*). Si tenemos en cuenta los datos anteriores, podríamos determinar una estimación teórica del ratio Glu/Gln en CO de 2,5-6,25 y en CPM de 1,2-3, de manera que los resultados obtenidos en nuestro estudio, tanto para los pacientes como para los controles, en la mayoría de los casos se encontrarían dentro de los márgenes teóricos determinados.

Mayor ratio Glu/Gln en la corteza occipital en pacientes con migrañas

Un incremento en el ratio Glu/Gln en la corteza occipital podría ser un epifenómeno o bien la consecuencia de una hiperactividad neuronal mantenida, pero de acuerdo a la hipótesis planteada, podría ser también un hallazgo indirecto que explicase por qué la corteza occipital posee una mayor predisposición para la ignición de la DCP en los pacientes con migraña. Un incremento en el ratio Glu/Gln podría de manera indirecta reflejar una mayor proporción de neuronas respecto a la cantidad de astrocitos. Si los astrocitos son los responsables, entre otras actividades, de mantener una adecuada homeostasis para el potasio y para el glutamato, hacer más eficiente la

neurotransmisión glutamatérgica y el consumo energético asociado de la neurona, se podría plantear que en aquellos individuos en los que la desproporción es más desventajosa en la corteza occipital, determinadas situaciones o factores precipitantes, podrían terminar por desequilibrar una precaria situación y desencadenar un ataque de migraña. Estos factores precipitantes, como son los estímulos sensoriales mantenidos y repetidos, el estrés o los cambios hormonales en la mujer (*Sachs et al, 2007; Eikermann-Haerter et al, 2007*), podrían ser los responsables de favorecer la superación de un umbral crítico.

De acuerdo con los últimos estudios genéticos realizados en amplias poblaciones de pacientes con migraña, la identificación de una región del genoma que podría estar implicado en la disminución de la expresión de EAAT-2 (*excitatory amino acid transporter*), el transportador de Glu situado en el astrocito en la terminal sináptica (Anttila et al, 2010; Anttila et al, 2011), el hallazgo descrito en nuestro estudio de un mayor ratio Glu/Gln, también podría explicarse, no por una disminución relativa en la densidad de los astrocitos en la corteza occipital en los pacientes con migraña, si no por una menor capacidad de los astrocitos para la captación del glutamato de la terminal sináptica. De esta manera, una menor cantidad de Glu sería recaptado en los astrocitos, siendo menor el metabolismo a glutamina, y mayor la disponibilidad de Glu en la terminal sináptica.

Si tenemos en cuenta, que la exposición crónica a topiramato (fármaco de primera línea empleado en el tratamiento preventivo de la migraña) parece incrementar la expresión del transportador de Glu en el astrocito (*Poulsen et al, 2006*), esto nos permitiría además explicar cómo en sujetos sanos expuestos a topiramato se incrementan los niveles de glutamina en la corteza cerebral (*Moore et al, 2006*).

Recientemente se ha demostrado mediante ERM-H1 como se produce un incremento estadísticamente significativo en los niveles de Glu en la corteza occipital de los sujetos sanos, a la vez que se produce un descenso significativo en los niveles

de Gln, durante la aplicación de estímulos visuales (*Lin et al, 2012*). De esta forma se explicaría como los estímulos sensoriales mantenidos podrían terminar por desequilibrar el precario equilibrio glutamatérgico en la corteza occipital en los pacientes con migrañas.

El incremento de Glu y de potasio en el espacio extracelular por encima de unos determinados umbrales, serían en última instancia los responsables de la ignición de la DCP (*Charles et al, 2009*). La DCP podría ser la consecuencia de estas alteraciones homeostáticas, pero también podría ser considerada como un mecanismo protector, que pondría fin a una situación de hiperactividad y de desequilibrio mantenido. En diferentes modelos experimentales, pre-condicionando la corteza cerebral con ondas recurrentes de DCP en animales a los que se les va a ocluir la arteria carótida interna, se ha observado que se reduce el daño tisular producido por la isquemia y mediado por la excitotoxicidad glutamatérgica (*Kawahara et al, 1995*). El fenómeno de la DCP produce además cambios en la expresión génica, regulando genes que son intrínsecos a la propia propagación de la DCP y a su respuesta vascular, genes que desempeñan además un papel neuroprotector y reducen la neurotransmisión excitotóxica en tejidos sometidos a isquemia (*Shen P.J. et al, 1999; Choudhuri et al, 2002; Wiggins et al, 2003; Yanamoto et al, 2004*).

Si tenemos en cuenta que el comportamiento del sujeto con migrañas durante un ataque es característico, precisando el paciente permanecer inmóvil, en reposo, evitando todo tipo de estímulo físico o actividad mental (*Montagna et al, 2010*), es lógico plantear que la cefalea migrañosa desencadenada por la activación del STV (*Buzzi et al, 1995; Sánchez del Río et al, 2004*), podría ser una respuesta adaptativa que protegiera y permitiera un reequilibrio en el córtex cerebral sobre-estimulado.

En los pacientes con migraña, se ha demostrado que los niveles plasmáticos de glutamato son mayores durante el periodo interictal respecto a los hallados en los controles sanos, niveles que incluso se incrementan durante el ataque de migraña, y se reducen si el tratamiento profiláctico es efectivo (*Ferrari et al, 1990; Ferrari et al,*

2009). La barrera hematoencefálica no es permeable al glutamato plasmático, pero sin embargo, existen transportadores para Glu, además de en las neuronas y los astrocitos, en las células endoteliales de los capilares sanguíneos, que participan en la retirada del Glu extracelular hacia el torrente sanguíneo para evitar su efecto excitotóxico (*Helms et al*, 2012). Estos datos podrían explicarse en el contexto de un mayor ratio Glu/Gln en la corteza occipital en los pacientes con migraña, ya que la superación de un determinado umbral de Glu en el espacio extracelular, no solo pondría en marcha una serie de fenómenos, antes explicados, que desencadenarían en un ataque de migraña, sino que además se pondrían en marcha una serie de mecanismos, que intentarían la normalización de los niveles de Glu extracelular.

De acuerdo con la hipótesis planteada, esperaríamos encontrar un mayor nivel de Glu y un menor nivel de Gln en la CO en los pacientes con migrañas. Aunque las diferencias observadas fueron del signo indicado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de Glu [0,52 (IC 95%: -0,31 a 1,35)], de Gln [-0,41 (IC 95%: -1,03 a 0,2)] o en el ratio Gln/Cr -0,11 (IC 95%: -0,002 a 0,22)]. Sin embargo, consideramos que estos datos pueden estar influenciados por la peor precisión en la determinación de los niveles de glutamina, y en menor medida de glutamato, en la CO, lo que supone una mayor dispersión de los datos obtenidos.

Mayor ratio Glu/Cr en corteza prefrontal medial en migrañosos

El hallazgo de mayores niveles de Glu y los elevados ratios de Glu/Cr observados en la corteza prefrontal medial podrían ser un indicativo de diferencias glutamatérgicas difusas en el córtex cerebral en pacientes con migrañas durante el periodo interictal respecto a los controles. Sin embargo, una mayor proporción relativa de astrocitos (y por ende, mayor concentración teórica de glutamina) en CPM respecto a la CO podría suponer una ventajosa compensación, de manera que la zona

con un mayor ratio Glu/Gln (es decir, la CO) fuese la más vulnerable ante los factores que terminan por desencadenar un ataque de migraña.

Aunque los datos observados en la CPM (mayores niveles de Glu y mayor ratio Glu/Cr) pudieran ser indicativos de un mayor estado de difusa hiperexcitabilidad neuronal, también podrían ser la consecuencia inespecífica de la respuesta normal al dolor. Hay que tener en cuenta que en el estudio (aunque las ERM se realizaron en el periodo interictal) se incluyeron mujeres con frecuentes ataques mensuales de migraña. En varios estudios de RM funcional se ha demostrado que la CPM participa en la respuesta emocional a los estímulos dolorosos (*Vogt et al, 1996*). De hecho, en un estudio de ERM-H1 se ha observado como los niveles de Glu se incrementan en esta región en respuesta a los estímulos dolorosos (*Mullins et al, 2005*). Además, en los pacientes con migrañas parece existir también anormalidades metabólicas funcionales en el córtex cingulado anterior, incluso durante los periodos interictales (*Kim et al, 2010*), y para algunos autores estos hallazgos podrían ser consecuencia de los estímulos dolorosos intermitentes que ocurren en los pacientes con migrañas (*Prescot et al, 2009*).

No hemos realizado un estudio estadístico comparativo entre los resultados obtenidos en el vóxel anterior (CPM) y el posterior (CO) por considerar que el tamaño y la proporción de sustancia blanca y gris en uno y otro vóxel podrían hacer difícilmente interpretable los resultados.

V-3. RESULTADOS EN EL CONTEXTO DE LA LITERATURA.

Existen diferentes estudios llevados a cabo mediante ERM-1H en pacientes con migraña.

En el estudio realizado por Schulz *et al.* no se encontraron diferencias significativas en los ratios (NAA/Cr, Cho/Cr y NAA/Cho) entre los pacientes con migraña y los controles. Este estudio se realizó con una RM craneal de 2 Teslas y el vóxel se situó en la corona radiada con el propósito de incluir el máximo de sustancia blanca posible [85]. En nuestro estudio, tampoco encontramos diferencias en los ratios mencionados, pero nuestro interés se centró en la determinación del ratio Glu/Gln en la CO, donde situamos el vóxel con la intención de abarcar la mayor cantidad posible de sustancia gris.

Prescot *et al.*, empleando una RM craneal de 4 Teslas, demostraron un exceso de Glu en la terminal sináptica en forma una mayor concentración de NAAG (dipéptido formado por la unión de Glu y NAA) en el córtex cingulado anterior en pacientes con migrañas respecto a sujetos sanos analizados en el periodo interictal (Prescot *et al.*, 2009). Sin embargo, no detectaron diferencias en los niveles de Glu o de Glu/Cr. Las discrepancias entre este estudio y los resultados que presentamos pueden ser debidas no solo a las diferencias en el abordaje metodológico y en la cuantificación mediante ERM, si no también a que la muestra analizada fue menor (diez pacientes y ocho controles) lo cual podría limitar el poder estadístico e incrementar la probabilidad de un error estadístico tipo II. En cualquier caso la región de interés de este estudio estuvo limitada a la corteza cingulada y no se valoró la corteza occipital.

Sólo existen 3 artículos en la literatura científica que hayan centrado el estudio de ERM en el CO, aunque ninguno cuantificó las concentraciones de Glu o Gln y todos ellos fueron realizados mediante una RM de 1.5 Teslas (Watanabe *et al.*, 1996; Sandor *et al.*, 2005; Sarchielli *et al.*, 2005). Watanabe *et al.*, describieron un

incremento en las concentraciones de lactato en la CO en los pacientes con migrañas con aura durante el periodo interictal. Sandor *et al.*, cuantificaron los metabolitos en la CO durante la estimulación lumínica, demostrando que en los pacientes con migraña con aura existía un incremento en el lactato durante el periodo interictal, pero que éste no se incrementaba durante la estimulación. Un abordaje similar fue empleado por Sarchielli *et al.*, quienes demostraron una disminución en la señal de NAA después de la estimulación fótica y un ligero incremento en el pico de lactato en pacientes con migraña con aura respecto a pacientes con migraña sin aura y controles. Sin embargo, un estudio más reciente, realizado mediante una RM de 3 Teslas, limitado a pacientes con migraña sin aura, no demostró ningún incremento de lactato en el lóbulo occipital tanto en el periodo interictal como después de la estimulación fótica (Reyngoudt *et al.*, 2011b).

V-4. LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO.

Son varias las limitaciones de nuestro estudio que debemos tener en cuenta a la hora de valorar los resultados.

En primer lugar, nuestros resultados pueden estar influenciados por el hecho de que estudiáramos una población seleccionada de mujeres jóvenes que presentaban frecuentes ataques de migraña. Nuestro propósito fue estudiar una población homogénea, por lo que los resultados en nuestro grupo de pacientes con migrañas podrían no ser generalizables. Aunque consideramos además que los pacientes incluidos fueron analizados en el periodo interictal (el estudio se realizaba en aquellos pacientes que no hubieran presentado cefalea las 24 horas antes de la cita), somos conscientes de que no tuvimos en cuenta si la desarrollaron en las horas posteriores y por lo tanto alguno de los estudios pudo haberse realizado en una fase prodrómica.

La segunda limitación puede derivarse de la exclusión *a posteriori* del análisis de aquellas mediciones en las que se obtuvieron valores extremos en los parámetros de CRLBs (SD%) de Gln. En cualquier método de cuantificación la presencia de valores extremos debe ser analizada cuidadosamente, pues puede reflejar información importante sobre el proceso que estamos estudiando, así como sobre la herramienta que estamos empleando para su estudio. En nuestro trabajo, los estudios que presentaban valores extremos de CRLBs (SD%) de Gln, como reflejan los datos, eran indicativos de un error en la medición (cuantificación irreal), derivados como comentaremos a continuación de la escasa precisión en la cuantificación de Gln. En cualquier caso, no hubo diferencias en el número de estudio eliminados *a posteriori* en ambos grupos de estudio, por lo que consideramos que no incurrimos en ningún sesgo.

Por último, la principal limitación de nuestro estudio, viene determinada por la escasa precisión en la cuantificación de glutamina. Esto es debido a las relativas bajas concentraciones de glutamina y al solapamiento espectral entre Gln y Glu. A pesar de

las limitaciones técnicas en el análisis espectral de la concentración de glutamina, principalmente en la corteza occipital donde se presupone una menor concentración, la metodología empleada fue la misma en ambos grupos, y aún así fuimos capaces de demostrar diferencias estadísticamente significativas en el ratio Glu/Gln. En nuestra opinión, una falta de precisión en la medición mediante ERM de la concentración de glutamina no invalida los resultados, pero dificulta encontrar diferencias (en el caso de que existieren) estadísticamente significativas por aumentar la dispersión de los resultados obtenidos en ambos grupos, de manera que sólo es posible hallar diferencias si éstas son importantes o el tamaño muestral empleado es lo suficientemente grande. En cualquier caso, las medias obtenidas en los valores de CRLBs (SD%) de Gln en nuestro estudio fueron similares a las obtenidas por Ongür *et al.*, aunque fueron peores a las obtenidas por otros autores (*Moore et al, 2006; Yang et al, 2008*). Sin embargo, a pesar la variabilidad en las concentraciones en los metabolitos determinados mediante espectroscopía inherentes a la diferentes secuencias, metodología y análisis empleados en los diferentes estudios, la cuantificación de los ratios Glu/Gln, Glu/Cr y Gln/Cr determinados en nuestro análisis fue similar a la hallada por otros autores tanto en la corteza occipital (*Ongür et al, 2008*) como en la corteza prefrontal (*Changho Choi et al, 2006*). Además, los valores obtenidos mediante ERM en el ratio Glu/Gln en CPM, tanto en pacientes con migrañas 2,625 (SD=1,61), como en los controles 2,789 (SD=1,11), fueron similares al valor estimado de 2,96 obtenido mediante estudios bioquímicos *postmortem* en el córtex prefrontal (*Lavoie et al, 1987*).

Somos conscientes de las limitaciones de nuestro estudio, sobre todo las inherentes a la cuantificación y determinación de glutamina, por lo que en un futuro, una mejor y precisa estimación de los niveles de glutamina permitirá clarificar las diferencias halladas en el ratio Glu/Gln durante el periodo interictal, además de poder valorar si hay cambios durante un ataque de migraña o en respuesta a los fármacos empleados en el tratamiento preventivo de la migraña. En el caso del topiramato

(fármaco preventivo de primera línea) se ha demostrado que se incrementan los niveles de glutamina en sujetos sanos (*Moore et al, 2006*), por lo que se podría analizar si la respuesta terapéutica dependería o estaría relacionada con una disminución en el ratio Glu/Gln.

En **conclusión**, la demostración de una mayor ratio Glu/Cr en la corteza prefrontal medial (pero sin diferencias en el ratio Glu/Gln) y de un mayor ratio de Glu/Gln en la corteza occipital durante el periodo interictal en las mujeres con migrañas respecto a los controles podría ser un importante dato a la hora de plantearnos las bases fisiopatológicas de la migraña y de preguntarnos qué predispone a unos sujetos respecto a otros a padecer una cefalea con unas particularidades tan diferenciadoras como son los ataques de migraña.

Consideramos que un **mayor ratio Glu/Gln** podría implicar diferencias en la homeostasis glutamatérgica o bien ser indicativo de una mayor proporción de neuronas respecto a astrocitos en la corteza occipital en los pacientes con migrañas, situación que podría suponer una predisposición y vulnerabilidad del córtex occipital para que ante determinados estímulos y factores desencadenantes concurren los mecanismos que en última instancia son responsables del inicio de un ataque de migraña.

Planteamos que un **mayor ratio Glu/Cr** en la corteza prefrontal medial en pacientes con migraña podría ser consecuencia directa de la activación repetitiva de las estructuras cerebrales implicadas en la percepción y respuesta emocional a los estímulos dolorosos.

VI- CONCLUSIONES

VI- CONCLUSIONES

1) En el estudio realizado se demuestra un **mayor ratio Glu/Gln** (incremento estadísticamente significativo) en la **corteza occipital** en las mujeres con migrañas durante el periodo interictal respecto a los controles. Sin embargo, no se observa diferencia en el ratio Glu/Gln en la corteza prefrontal medial.

2) En la **corteza prefrontal medial** se observa, en las mujeres con migrañas respecto a los controles, un incremento estadísticamente significativo en la concentración de **Glu** y en el **ratio Glu/Cr**. En el análisis por subgrupos también se observa una diferencia significativa en el ratio Glu/Cr entre los pacientes con migraña, con o sin aura, respecto a los sujetos control.

3) No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de Glu y de Gln en la corteza occipital entre ambos grupos.

4) En el resto de las variables analizadas (NAA/Cr, Cho/Cr, Glu, Gln, Glu/Cr y Gln/Cr) no se observan diferencias significativas, tanto en CO como en CPM, en mujeres con el diagnóstico de migraña respecto a sujetos control.

5) No se observa ninguna correlación entre el número de migrañas al mes y el ratio Glu/Gln, tanto en CO como en CPM, en los pacientes con migrañas.

6) No se observa ninguna relación lineal entre la edad y el ratio Glu/Gln, tanto en CO como en CPM, ni en mujeres con migrañas ni en los sujetos control.

VII-GLOSARIO Y ABREVIATURAS

GLOSARIO

- **Cefalea primaria:** La cefalea primaria es aquella en la cual no hay una enfermedad de fondo y la cefalea por sí sola constituye el problema básico del paciente, mientras que la cefalea secundaria es aquella en la cual el dolor de cabeza es síntoma de enfermedad.

- **Comorbilidad:** presencia de más de una enfermedad en una persona en un momento determinado.

- **Cramer–Rao lower bounds (CRLBs):** LCModel® determina la concentración absoluta para cada metabolito y su porcentaje de desviación estándar (%SD) que es una estimación de la exactitud de la medición:

* %SD>50% indica que el rango estimado de la concentración de un metabolito se encuentra entre cero y dos veces la concentración estimada.

* %SD<20% se considera aceptable la fiabilidad de la estimación realizada.

- **Depresión cortical propagada:** alteración de la actividad eléctrica de la corteza cerebral que consiste en una onda de excitación seguida por otra de inhibición que partiendo de la región occipital (en el caso de la migraña), se extiende por la corteza cerebral a una velocidad aproximada de 3 mm por minuto.

- **Desviación estándar:** medida de la dispersión de los valores de una variable en torno a la media.

- **Diagrama de cajas (Box Plot):** Gráfico en el que se representan los índices estadísticos basados en ordenaciones. El diagrama de cajas está formado por rectángulos cuyas dos bases representan los cuartos tercero y primero (H3 y H1). La

línea central marca la posición de la **mediana**. Dos trazos horizontales (llamados patillas o *whiskers*) se unen a cada base del rectángulo con una línea perpendicular y señalan los valores adyacentes que corresponden al máximo y mínimo valor de la distribución que no se consideran valores anómalos o extremos (*extremes*). Los valores extremos se encuentran a una distancia superior a 1,5 veces la amplitud intercuartil [H1-H3] desde las bases del rectángulo.

- **Estimulación magnética transcraneal:** forma no invasiva de estimulación de la corteza cerebral. Consiste en la despolarización selectiva de la corteza cerebral mediante pulsos magnéticos de intensidades específicas. Estos pulsos pueden ser únicos en la estimulación magnética transcraneana, o bien regulares y repetitivos, en la modalidad que toma el nombre de estimulación magnética transcraneana repetitiva. La despolarización referida obedece al principio de inducción electromagnética descubierto por M. Faraday.

- **Glutamato:** El ácido glutámico, o en su forma ionizada, el glutamato (Glu) es uno de los 20 aminoácidos que forman parte de las proteínas. Es además el neurotransmisor excitatorio por excelencia de la corteza cerebral humana.

- **Inflamación Neurógena o aséptica:** La activación del sistema trigémino-vascular, además de vehicular la información nociceptiva hacia el núcleo caudal del trigémino, puede generar una inflamación meníngea estéril mediante la liberación de neuropéptidos (PRGC, SP NKA). El resultado es la producción de vasodilatación con extravasación de proteínas, agregación plaquetaria y liberación de serotonina.

- **Molar o masa molar:** La masa molar (símbolo M) es la masa por unidad de cantidad de sustancia, o sea la masa de un mol de un elemento o compuesto químico.

Es una propiedad física característica de cada sustancia pura y su unidad en el SI es gramos por mol (g/mol o g mol⁻¹).

- **Periodo interictal:** Intervalo de tiempo que transcurre entre una crisis y la siguiente.

- **Potenciales evocados visuales (PEV):** exploración neurofisiológica que evalúa la función del sistema visual. Los PEV resultan de los cambios producidos en la actividad bioeléctrica occipital tras estimulación luminosa. El estímulo más frecuentemente utilizado es una imagen en tablero de ajedrez, con una serie de cuadros blancos y negros que van alternándose.

- **Receptores glutamatérgicos:** El glutamato, una vez liberado en la sinapsis, actúa sobre la neurona postsináptica a través de diferentes tipos de receptores glutamatérgicos que se clasifican en metabotrópicos (acoplados a un complejo proteico-enzimático que genera segundos mensajeros) e ionotrópicos (su activación por el neurotransmisor permite el paso de determinados iones).

Tres son los receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópico: 1) receptores NMDA (sensibles a N-metil de Aspartato, fármaco agonista); 2) AMPA y 3) Kainato.

- **Sistema trigémino-vascular:** El nervio del trigémino transmite las sensaciones de dolor procedentes de la piel, duramadre y vasos sanguíneos intracraneales. Tras una sinapsis en el ganglio trigeminal conectan con el núcleo del trigémino en su porción inferior o caudal y la medula cervical en los segmentos C1 y C2. Las aferencias del trigémino pueden activarse de manera antidrómica y liberar el péptido relacionado con el gen de la calcitonina en los vasos sanguíneos.

ABREVIATURAS

BOLD: *Blood-oxygen-level dependent*

DCP: Depresión cortical propagada

Cho: Colina

CO: Corteza occipital

CPM: Corteza prefrontal medial

Cr: Creatina

EAAT- 2: *Excitatory amino acid transporter*

EEG: Electroencefalografía

EMT: Estimulación magnética transcraneal

ERM: Espectroscopía por Resonancia Magnética

ERM-H1: Espectroscopía por Resonancia Magnética del núcleo del hidrógeno.

Glu: Glutamato

Gln: Glutamina

IHCD: *International Classification of Headache Disorders*

MCA: Migraña con aura

MHF: Migraña Hemipléjica Familiar

mM: mili Molar

MSA: Migraña sin aura

NAA: N-Acetil aspartato

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Óxido nítrico

PET: *Positron Emission Tomography*

PME: Potencial motor evocado

PRGC: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

PVE: Potenciales visuales evocados

RM: Resonancia Magnética

STV: Sistema trigémino-vascular

TE: Tiempo de eco

TR: Tiempo de repetición

VIII- BIBLIOGRAFÍA

BILIOGRAFÍA

- 1) Afra J, Cecchini AP, De Pasqua V, Albert A, Schoenen J. (1998). Visual evoked potentials during long periods of pattern-reversal stimulation in migraine. *Brain*, 121, 233-241.
- 2) Afra J, Mascia A, Gérard P, *et al.* (1998) Interictal cortical excitability in migraine: a study using transcranial magnetic stimulation of motor and visual cortices. *Ann Neurol*, 44, 209-215.
- 3) Ambrosini A, Rossi P, De Pasqua V, Pierelli F, Schoenen J. (2003). Lack of habituation causes high intensity dependence of auditory evoked cortical potentials in migraine. *Brain*, 126, 2009-2015.
- 4) Ambrosini A, Schoenen J. (2006). Electrophysiological response patterns of primary sensory cortices in migraine. *J Headache Pain*, 7, 377-388.
- 5) Anttila V, Stefansson H, Kallela M, *et al.* (2010). Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet*, 42, 869-873.
- 6) Anttila V, Wessman M, Kallela M, Palotie A. (2011). Towards an understanding of genetic predisposition to migraine. *Genome Med*, 3, 17-21.
- 7) Ashburner J, Friston KJ. (1997). Multimodal image coregistration and partitioning. An unified framework. *Neuroimage*, 6, 209-217.

- 8) Ashburner J, Friston KJ. (2000). Voxel-Based Morphometry-The Methods. *Neuroimage*, 11, 805-821.
- 9) Aurora SK, Cao Y, Bowyer SM, Welch KM. (1999). The occipital cortex is hyperexcitable in migraine: Experimental evidence. *Headache*, 39, 469-476.
- 10) Aurora SK, Ahmad BK, Welch KM, Bhardhwaj P, Ramadan N. (1998). Transcranial magnetic stimulation confirms hyperexcitability of occipital cortex in migraine. *Neurology*, 50, 1111-1114.
- 11) Aurora SK, Welch KM, Al-Sayed F. (2003). The threshold for phosphene is lower in migraine. *Cephalalgia*, 23, 258-63.
- 12) Ayata C, Jin H, Kudo C, *et al.* (2006). Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol*, 59, 652-661.
- 13) Battelli L, Black KR, Wray SH. (2002). Transcranial magnetic stimulation of visual area V5 in migraine. *Neurology*, 58, 1066-1069.
- 14) Blau JN. (1995). Migraine with aura and migraine without aura are not different entities. *Cephalalgia*, 15, 186-190.
- 15) Bowyer M, Aurora S, Moran E, Tepley N, Welch M. (2001). Magnetoencephalographic fields from patients with spontaneous and induced migraine. *Ann Neurol*, 50, 582-587.
- 16) Buzzi MG, Bonamini M, Moskowitz MA. (1995). Neurogenic model of migraine. *Cephalalgia*, 15, 277-280.

- 17) Changho Choi, Nicholas J. Coupland, *et al.* (2006). Measurement of brain glutamate and glutamine by spectrally-selective refocusing at 3 Tesla. *Mag Reson Med*, 55, 997-1005.
- 18) Charles A, Brennan K. (2009). Cortical spreading depression: new insights and persistent questions. *Cephalalgia*, 29, 1115-1124.
- 19) Chasman DI, Schürks M, Anttila V, *et al.* (2011). Genomewide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet*, 12, 695-698.
- 20) Chorlton P, Kane N. (2000). Investigation of the cerebral response to flicker stimulation in patients with headache. *Clin Electroencephalogr*, 31, 83-87.
- 21) Choudhuri R, Cui L, Yong C, *et al.* (2002). Cortical spreading depression and gene regulation: relevance to migraine. *Ann Neurol*, 51, 499-506.
- 22) Chronicle EP, Wilkins AJ, Coleston DM. (1995). Thresholds for detection of a target against a background grating suggest visual dysfunction in migraine with aura but not migraine without aura. *Cephalalgia*, 15, 117-122.
- 23) Cosentino G, Fierro B, Vigneri S, *et al.* (2011). Impaired glutamatergic neurotransmission in migraine with aura? Evidence by an input-output curves transcranial magnetic stimulation study. *Headache*, 51, 726-733.

- 24) Cuadrado ML, Young WB, Fernández-de-las-Peñas C, Arias JA, Pareja JA. (2008). Migrainous corpalgia: body pain and allodynia associated with migraine attacks. *Cephalalgia*, 28, 87-91.
- 25) Cutrer FM, Sorensen AG, Weisskoff RM, *et al.* (1998). Perfusion-weighted imaging defects during spontaneous migrainous aura. *Ann Neurol*, 43, 25-31.
- 26) Cutrer FM. (2006). Pathophysiology of migraine. *Semin Neurol*, 26, 171-180.
- 27) Cutrer FM, Charles A. (2008). The neurogenic basis of migraine. *Headache*, 48, 1411-1414.
- 28) Deitmer JW, Bröer A, Bröer S. (2003). Glutamine efflux from astrocytes is mediated by multiple pathways. *J Neurochem*, 87, 127-135.
- 29) Denuelle M, Fabre N, Payoux P, Chollet F, Geraud G. (2008). Posterior cerebral hypoperfusion in migraine without aura. *Cephalalgia*, 28, 856-862.
- 30) Diamond MC, Scheibel AB, Murphy GM Jr, Harvey T. (1985). On the brain of a scientist: Albert Einstein. *Exp Neurol*, 88, 198-204.
- 31) Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, *et al.* (2005). Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet*, 366, 371-377
- 32) Eikermann-Haerter K, Kudo C, Moskowitz MA. (2007). Cortical spreading depression and estrogen. *Headache*, 47, 79-85.

- 33) Escartin C, Valette J, Lebon V, Bonvento G. (2006). Neuron-astrocyte interactions in the regulation of brain energy metabolism: a focus on NMR spectroscopy. *J Neurochem*, 99, 393-401.
- 34) Ferrari MD, Odink J, Bos KD, Malessy MJ, Bruyn GW. (1990). Neuroexcitatory plasma amino acids are elevated in migraine. *Neurology*, 40, 1582-1586.
- 35) Ferrari A, Spaccapelo L, Pinetti D, Tacchi R, Bertolini A. (2009). Effective prophylactic treatments of migraine lower plasma glutamate levels. *Cephalalgia*, 29, 423-429.
- 36) Giffin NJ, Kaube H. (2002). The electrophysiology of migraine. *Curr Opin Neurol*, 15, 303-309.
- 37) Goadsby PJ, Charbit AR, Andreou AP, Akerman S, Holland PR. (2009). Neurobiology of migraine. *Neuroscience*, 161, 327-341.
- 38) Golla FL, Winter AL. (1959). Analysis of cerebral responses to flicker in patients complaining of episodic headache. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 11, 539-549.
- 39) González de la Aleja J, Porta-Etessam J, Sepulveda-Sánchez JM, Rodríguez M. (2006). The pathophysiology of migraine. Reflections on the glutamatergic hypothesis. *Rev Neurol*, 43, 481-488.
- 40) Gorji A, Scheller D, Straub H, *et al.* (2001). Spreading depression in human neocortical slices. *Brain Res*, 906, 74-83.

- 41) Govindaraju V, Young K, Maudsley A. (2000). Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed*, 13, 129-153.
- 42) Graham JR, Wolff HG. (1938). Mechanism of migraine headache and action of ergotamine tartrate. *Arch Neurol Psychiatry*, 39, 737-763.
- 43) Hadjikhani N, Sánchez Del Rio M, Wu O, *et al.* (2001). Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 4687-4692.
- 44) Hansson E, Muyderman H, Leonova J, *et al.* (2000). Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem Int*, 37, 317-329.
- 45) Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. (2004). The international classification of headache disorders, 2nd edition. *Cephalalgia*, 24, 9-160.
- 46) Helms HC, Madelung R, Waagepetersen HS, Nielsen CU, Brodin B. (2012). In vitro evidence for the brain glutamate efflux hypothesis: brain endothelial cells cocultured with astrocytes display a polarized brain-to-blood transport of glutamate. *Glia*, 60, 882-893.
- 47) Kandel E, (2001). Neuronas. En Kandel E, Schwartz J, Jessel T, (Eds.): *Principios de Neurociencias* (pp. 20-35). Madrid: McGrawHill/Interamericana de España.

- 48) Kawahara N, Ruetzler CA, Klatzo I. (1995). Protective effect of spreading depression against neuronal damage following cardiac arrest cerebral ischaemia. *Neurol Res*, 17, 9-16.
- 49) Kim JH, Kim S, Suh SI, *et al.* (2010). Interictal metabolic changes in episodic migraine: a voxel-based FDG-PET study. *Cephalalgia*, 30, 53-61.
- 50) Kvamme E, Roberg B, Torgner IA. (2000). Glutamine transport in brain mitochondria. *Neurochem Int*, 37, 131-138.
- 51) Largo C, Ibarz JM, Herreras O. (1997). Effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain in situ. *J Neurophysiol*, 78, 295-307.
- 52) Lashley KS. (1941). Patterns of cerebral integration indicated by the scotoma of migraine. *Arch Neurol Psychiatry*, 42, 259-264.
- 53) Lauritzen M. (1994). Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain*, 117, 199-210.
- 54) Lavoie J, Giguere JF, Layrargues GP, Butterworth RF. (1987). Amino-acid changes in autopsied brain-tissue from cirrhotic-patients with hepatic encephalopathy. *J Neurochem*, 49, 692-697.
- 55) Leao AAP. (1994). Spreading depression of activity in cerebral cortex. *J Neurophysiol*, 7, 359-390.

- 56) Leo L, Gherardini L, Barone V, *et al.* (2011). Increased susceptibility to cortical spreading depression in the mouse model of familial hemiplegic migraine type 2. *PLoS Genet*, 7, e1002129, 1-12.
- 57) Leuba G, Garey LJ. (1989). Comparison of neuronal and glial numerical density in primary and secondary visual cortex of man. *Experimental Brain Research*, 77, 31-38.
- 58) Lian XY, Stringer JL. (2004). Astrocytes contribute to regulation of extracellular calcium and potassium in the rat cerebral cortex during spreading depression. *Brain Res*, 1012, 177-184.
- 59) Lin Y, Stephenson MC, Xin L, Napolitano A, Morris PG. (2012). Investigating the metabolic changes due to visual stimulation using functional proton magnetic resonance spectroscopy at 7T. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32, 1484-1495.
- 60) Linde M, Mellberg A, Dahlöf C. (2006). The natural course of migraine attacks. A prospective analysis of untreated attacks compared with attacks treated with a triptan. *Cephalalgia*, 26, 712-721.
- 61) Martín H, del Río MS, de Silanes CL, *et al.* (2011). Photoreactivity of the occipital cortex measured by functional magnetic resonance imaging-blood oxygenation level dependent in migraine patients and healthy volunteers: pathophysiological implications. *Headache*, 51, 1520-1528.
- 62) Martins-Ferreira H, Nedergaard M, Nicholson C. (2000). Perspectives on spreading depression. *Brain Res Brain Res Rev*, 32, 215-234.

- 63) McKendrick AM, Badcock DR. (2004). Motion processing deficits in migraine. *Cephalalgia*, 24, 363-372.
- 64) Milner PM. (1959). Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leao. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 10, 705.
- 65) Montagna P, Pierangeli G, Cortelli P. (2010). The primary headaches as a reflection of genetic darwinian adaptive behavioral responses. *Headache*, 50, 273-289.
- 66) Moore CM, Wardrop M, deB Frederick B, Renshaw PF. (2006). Topiramate raises anterior cingulate cortex glutamine levels in healthy men; a 4.0 T magnetic resonance spectroscopy study. *Psychopharmacology*, 188, 236-243.
- 67) Moskowitz MA, Nozaki K, Kraig RP. (1993). Neocortical spreading depression provokes the expression of c-fos protein-like immunoreactivity within trigeminal nucleus caudalis via trigeminovascular mechanisms. *J Neurosci*, 13, 1167-1177.
- 68) Moskowitz MA, Bolay H, Dalkara T. (2004). Deciphering migraine mechanisms: clues from familial hemiplegic migraine genotypes. *Ann Neurol*, 55, 276-280.
- 69) Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*, 26, 523-530.
- 70) Obrenovitch TP, Urenjak J, Wang M. (2002). Nitric oxide formation during cortical spreading depression is critical for rapid subsequent recovery of ionic homeostasis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22, 680-688.

- 71) Ongür D, Jensen JE, Prescott AP, *et al.* (2008). Abnormal glutamatergic neurotransmission and neuronal-glial interactions in acute mania. *Biol Psychiatry*, 64, 718-726.
- 72) Oterino A, Toriello M, Castillo J, *et al.* (2012). Family-based association study of chromosome 6p12.2-p21.1 migraine locus. *Headache*, 52, 393-396.
- 73) Ozkul Y, Uckardes A. (2002). Median nerve somatosensory evoked potentials in migraine. *Eur J Neurol*, 9, 227-232.
- 74) Ozturk V, Cakmur R, Donmez B, *et al.* (2002). Comparison of cortical excitability in chronic migraine (transformed migraine) and migraine without aura. A transcranial magnetic stimulation study. *J Neurol*, 249, 1268-1271.
- 75) Pascual J. (2009). Migraña con y sin aura. Manifestaciones clínicas. En Mateos V, Pareja JA, Pascual J. (Eds.): *Tratado de cefaleas*. (pp. 131-166). Madrid: Luzán 5.
- 76) Perea G, Navarrete M, Araque A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*, 32, 421-431.
- 77) Petzold GC, Windmuller O, Haack S, *et al.* (2005). Increased extracellular K⁺ concentration reduces the efficacy of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists to block spreading depression-like depolarizations and spreading ischemia. *Stroke*, 36, 1270-1277.
- 78) Petroff OA, Errante LD, Rothman DL, Kim JH, Spencer DD. (2002). Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus. *Epilepsia*, 43, 703-710.

- 79) Porta-Etessam J, García-Cobos R, Cuadrado ML, *et al.* (2011). Neuro-otological symptoms in patients with migraine. *Neurologia*, 26, 100-104.
- 80) Poulsen CF, Schousboe I, Sarup A, White HS, Schousboe A. (2006). Effect of topiramate and dBcAMP on expression of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in astrocytes cultured separately, or together with neurons. *Neurochem Int*, 48, 657-661.
- 81) Prescott A, Becerra L, Pendse G, *et al.* (2009). Excitatory neurotransmitters in brain regions in interictal migraine patients. *Mol Pain*, 5, 34.
- 82) Provencher SW. (1993). Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med*, 30, 672-679.
- 83) Ramagopalan SV, Ramscar NE, Cader MZ. (2007). Molecular mechanisms of migraine. *J Neurol*, 254, 1629-1635.
- 84) Ray BS, Wolff HG. (1940) Experimental studies on headache. Pain-sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch Surg*, 41, 813-856.
- 85) Reuter U, Bolay H, Jansen-Olesen I, Chiarugi A, Sánchez del Río M. (2001). Delayed inflammation in rat meninges: implications for migraine pathophysiology. *Brain*, 124, 2490-2502.
- 86) Reyngoudt H, Paemeleire K, Descamps B, De Deene Y, Achten E. (2011a). 31P-MRS demonstrates a reduction in high-energy phosphates in the occipital lobe of migraine without aura patients. *Cephalalgia*, 31, 1243-1253.

- 87) Reyngoudt H, Paemeleire K, Dierickx A, *et al.* (2011b). Does visual cortex lactate increase following photic stimulation in migraine without aura patients? A functional (1)H-MRS study. *J Headache Pain*, 12, 295-302.
- 88) Robbins MS, Lipton RB. (2010). The epidemiology of primary headache disorders. *Semin Neurol*, 30, 107-119.
- 89) Rudkin T. (2004). Espectroscopia por RM y fundamentos bioquímicos de la patología neurológica. En Scott W. Atlas (Edd.) *RM de cabeza y columna*. (pp. 2021-2040) Madrid: MARBÁN, S.L.
- 90) Sachs M, Pape H-C, Speckmann E-J, Gorji A. (2007). The effect of estrogen and progesterone on spreading depression in rat neocortical tissues. *Neurobiol Dis*, 25, 27-34.
- 91) Sánchez del Rio M, Alvarez Linera J. (2004). Functional neuroimaging of headaches. *Lancet Neurol*, 3, 645-651.
- 92) Sánchez del Rio M, Reuter U, Moskowitz MA. (2006). New insights into migraine pathophysiology. *Curr Opin Neurol*, 19, 294-298.
- 93) Sándor PS, Dydak U, Schoenen J, *et al.* (2005). MR-spectroscopic imaging during visual stimulation in subgroups of migraine with aura. *Cephalalgia*, 25, 507-518.
- 94) Sarchielli P, Tarducci R, Presciutti O, *et al.* (2005). Functional 1H-MRS findings in migraine patients with and without aura assessed interictally. *Neuroimage*, 24, 1025-1031.

- 95) Sarchielli P. (2000). Nitric oxide metabolites, prostaglandins and trigeminal vasoactive peptides in internal jugular vein blood during spontaneous migraine attacks. *Cephalalgia*, 20, 907-918.
- 96) Shen J, Petersen KF, Behar KL, *et al.* (1999). Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 8235-8240.
- 97) Shen P.J, Gundlach A.L. (1999). Prolonged induction of neuronal NOS expression and activity following cortical spreading depression (SD): implications for SD- and NO-mediated neuroprotection. *Exp Neurol*, 160, 317-332.
- 98) Sherwood CC, Stimpson CD, Raghanti MA, Wildman DE, Uddin M. (2006). Evolution of increased glia–neuron ratios in the human frontal cortex. *PNAS*, 103, 13606-13611.
- 99) Schwedt TJ, Dodick DW. (2009). Advanced neuroimaging of migraine. *Lancet Neurol*, 8, 560-568.
- 100) Schoenen J, Ambrosini A, Sandor PS, Maertens de Noordhout A. (2003). Evoked potentials and transcranial magnetic stimulation in migraine: published data and viewpoint on their pathophysiologic significance. *Clin Neurophysiol*, 114, 955-972.
- 101) Schulz UG, Blamire AM, Corkill RG. (2007). Association between cortical metabolite levels and clinical manifestations of migrainous aura: an MR-spectroscopy study. *Brain*, 130, 3102-3110.

- 102) Silberstein SD. (1995). Migraine symptoms: results of a survey of self-reported migraineurs. *Headache*, 35, 387-396.
- 103) Stovner LJ, Zwart JA, Hagen K, Terwindt GM, Pascual J. (2006). Epidemiology of headache in Europe. *Eur J Neurol*, 13, 333-345.
- 104) Strecker T, Dux M, Messlinger K. (2002). Nitric oxide releases calcitonin gene-related peptide from rat dura mater encephali promoting increases in meningeal blood flow. *J Vasc Res*, 39, 489-496.
- 105) Tottene A, Conti R, Fabbro A, *et al.* (2009). Enhanced Excitatory Transmission at Cortical Synapses as the Basis for Facilitated Spreading Depression in CaV2.1 Knockin Migraine Mice. *Neuron*, 61, 762-773.
- 106) Van den Maagdenberg, A.M., Pietrobon, D., Pizzorusso, T, *et al.* (2004). A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron*, 40, 701-710.
- 107) Van den Maagdenberg AM, Haan J, Terwindt GM, Ferrari MD. (2007). Migraine: gene mutations and functional consequences. *Curr Opin Neurol*, 20, 299-305.
- 108) Van der Kamp W, Maassen Van Den Brink A, Ferrari MD, Van Dijk JG. (1996). Interictal cortical hyperexcitability in migraine patients demonstrated with transcranial magnetic stimulation. *J Neurol Sci*, 139, 106-110.

- 109) Vanmolkot KR, Babini E, de Vries B, *et al.* (2007). The novel p.L1649Q mutation in the SCN1A epilepsy gene is associated with familial hemiplegic migraine: genetic and functional studies. *Hum Mutat*, 28, 522.
- 110) Vogt BA, Derbyshire S, Jones AK. (1996). Pain processing in four regions of human cingulate cortex localized with co-registered PET and MR imaging. *Eur J Neurosci*, 8, 1461-1473.
- 111) Wang M, Obrenovitch TP, Urenjak J. (2003). Effects of the nitric oxide donor, DEA/NO on cortical spreading depression. *Neuropharmacology*, 44, 949-957.
- 112) Watanabe H, Kuwabara T, Ohkubo M, Tsuji S, Yuasa T. (1996). Elevation of cerebral lactate detected by localized ¹H-magnetic resonance spectroscopy in migraine during the interictal period. *Neurology*, 47, 1093-1095.
- 113) Welch KM, Levine SR, D'Andrea G, Schultz LR, Helpert JA. (1989). Preliminary observations on brain energy metabolism in migraine studied by in vivo phosphorus 31 NMR spectroscopy. *Neurology*, 39, 538-541.
- 114) Welch KM. (2003). Contemporary concepts of migraine pathogenesis. *Neurology*, 61, S2-8.
- 115) Wessman M, Terwindt GM, Kaunisto MA, Palotie A, Ophoff RA. (2007). Migraine: a complex genetic disorder. *Lancet Neurol*, 6, 521-532.
- 116) Wiggins AK, Shen PJ, Gundlach AL. (2003). Neuronal-NOS adaptor protein expression after spreading depression: implications for NO production and ischemic tolerance. *J Neurochem*, 87, 1368-1380.

- 117) Wolff HG. (1963). *Headache and other head pain*. 2^o ed. New York: Oxford University Press.
- 118) Woods RP, Iacoboni M, Mazziotta JC. (1994). Bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *N Engl J Med*, 331, 1689-1692.
- 119) Wray SH, Mijovic-Prelec D, Kosslyn SM. (1995). Visual processing in migraineurs. *Brain*, 118, 25-35.
- 120) Yanamoto H, Xue JH, Miyamoto S, *et al.* (2004). Spreading depression induces long-lasting brain protection against infarcted lesion development via BDNF gene-dependent mechanism. *Brain Res*, 1019, 178-188.
- 121) Yang S, Hu J, Kou Z, Yang Y. (2008). Spectral simplification for resolved glutamate and glutamine measurement using a standard STEAM sequence with optimized timing parameters at 3, 4, 4.7, 7, and 9.4T. *Magn Reson Med*, 59, 236-244.
- 122) Young WB, Oshinsky ML, Shechter AL, *et al.* (2004). Consecutive transcranial magnetic stimulation: phosphene thresholds in migraineurs and controls. *Headache*, 44, 131-135.
- 123) Zhang X, Levy D, Kainz V, *et al.* (2011). Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Ann Neurol*, 69, 855-865.

NOTA: Para la organización de las citas en el texto y las referencias de la bibliografía se ha utilizado el estilo Harvard, de acuerdo con las recomendaciones de la APA (*American Psychological Association, Publication Manual*)